

X

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE L. PASTEUR

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,
F. MESNIL, G. RAMON,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur.

Secrétaire de la Rédaction : A. BOQUET.

QR

1

A475

v.56

Jan.-June

1936

PER

TOME CINQUANTE-SIXIÈME

Janvier-Juin 1936

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

PARIS. — A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMP., 1, RUE CASSETTE. — 1936.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

OBSERVATIONS A PROPOS DES APPORTS ATMOSPHÉRIQUES DE SOUFRE COMBINÉ AUX TERRES ARABLES

par GABRIEL BERTRAND.

Lorsqu'on évapore à un petit volume une quantité notable d'eau de pluie, soit dans une capsule de porcelaine, soit dans une capsule de platine, en chauffant à l'aide d'un brûleur à gaz, comme on le pratique d'ordinaire dans les laboratoires, on trouve toujours dans le produit de la concentration une petite quantité d'acide sulfurique précipitable par le chlorure de baryum.

C'est ainsi que tout récemment Vincent, Herviaux et Sarrazin ont dosé dans les pluies de la région de Quimper de 4 à 7 milligrammes d'acide sulfurique par litre [1].

Mais, dans les mêmes conditions, on trouve toujours aussi de l'acide sulfurique en opérant avec de l'eau pure.

Ainsi, en ramenant 1 litre d'eau redistillée [2] à 50 cent. cubes par évaporation soit au bain-marie, soit sur une toile métallique ou à feu nu, à l'aide d'un brûleur de Bunsen, j'ai obtenu de 1 milligramme à 3 milligr. 5 de sulfate de baryum; si l'eau était faiblement alcalinisée au début par l'addition de 0 gr. 1 de carbonate de sodium, la quantité de sel barytique s'élevait de 2 milligr. 5 à 6 milligr. 8. C'est par évaporation au

bain-marie, qui demande le plus de temps, que la fixation d'acide sulfurique a été la plus forte et par chauffage sur toile métallique, au contraire, qu'elle a été la moins importante [3]. L'acide sulfurique vient des produits de la combustion du gaz, car la concentration de 1 litre de la même eau par distillation sous vide dans un appareil de verre n'a pas donné trace de sulfate de baryum [4].

Il résulte de ces observations que les dosages d'acide sulfurique ou de sulfates qui ont été faits antérieurement dans les eaux de pluie et dans la neige ne présentent pas de garantie et ne peuvent servir à des évaluations quant aux quantités de soufre combiné qui est apporté aux terres arables par les précipitations atmosphériques.

La cause d'erreur que je viens de signaler n'est pas la seule qui se présente lorsqu'il s'agit de doser le soufre contenu dans l'eau de pluie, surtout si ce dosage doit être effectué dans l'eau recueillie pendant une longue période, de trois mois à une année, par exemple. Au cours de cette période, en effet, des organismes et principalement des plantes se développent dans l'eau, fixant tout ou partie du soufre dans leurs tissus; de sorte qu'il ne faut pas seulement opérer le dosage sur l'eau filtrée, comme on le fait d'ordinaire, mais sur la totalité de la masse, après destruction convenable des matières organiques. Il faut encore tenir compte des matières minérales apportées par les vents, dont les unes, très ténues, proviennent souvent de fort loin, dont les autres, plus grossières, peuvent venir du voisinage immédiat.

- Voici, en définitive, la méthode à laquelle je me suis arrêté lorsque, pour avoir une idée de l'importance de l'apport du soufre atmosphérique dans la végétation, j'ai déterminé, trimestre par trimestre, pendant quinze mois, les quantités de soufre total contenues dans l'eau recueillie à l'Institut Pasteur, non loin de l'abri sous lequel nous avons expérimenté avec Silberstein l'action favorisante des sulfates sur la culture du colza [5].

L'eau de pluie est récoltée dans des cylindres de verre d'environ 50 centimètres de hauteur et 13 centimètres de diamètre. Ces récipients sont tout à fait pratiques : s'il tombe annuellement à Paris une couche d'eau de près de 60 centi-

mètres de hauteur, l'évaporation compense en partie les chûtes et il n'y a pas à craindre que les cylindres débordent; d'autre part, le diamètre est assez grand pour assurer la collection d'une quantité d'eau suffisante aux analyses. Quant à la forme, elle se prête au nettoyage et à la récolte totale des particules et des organismes tombés au fond ou fixés sur les parois intérieures.

Une précaution est à prendre, lorsqu'il fait très froid, pour éviter que le gel de l'eau recueillie entraîne la rupture des récipients : c'est d'ajouter un peu d'alcool redistillé, 10 à 20 p. 100, selon la température.

Pour l'analyse, le contenu du cylindre sur lequel on opère est transvasé dans un ballon distillatoire avec les matières solides qui s'y trouvent. En s'aidant d'une forte baguette de verre, munie d'un bouchon de liège à l'une de ses extrémités, on détache par frottement les particules adhérentes que l'on entraîne avec de l'eau pure. On termine le lavage en arrosant les parois avec une dizaine de centimètres cubes d'acide nitrique fumant et lorsque tout est passé dans le ballon on distille pour ainsi dire à sec, sous pression réduite. On verse maintenant dans le ballon de 10 à 30 cent. cubes d'acide nitrique fumant, selon la quantité de résidu, et l'on chauffe au bain-marie, en remuant de temps en temps, jusqu'à ce que les matières organiques soient dissoutes et qu'il n'y ait plus en suspension que des substances minérales. On transvase le produit de cette attaque dans une capsule de porcelaine, en se servant d'eau pure pour finir; on évapore au bain-marie chauffé électriquement, de manière à chasser la plus grande partie de l'acide; le résidu pâteux est alors traité par le carbonate de sodium et fondu au four électrique dans un creuset de nickel avec un mélange de nitrate et de carbonate alcalin, comme s'il s'agissait de doser le soufre total dans une plante ou dans la terre arable [6]. La silice, puis les oxydes de fer, de manganèse et d'aluminium, sont éliminés et, finalement, l'acide sulfurique est précipité par le chlorure de baryum [7].

Cette méthode a d'abord été appliquée du mois de mars 1931 au mois de septembre 1932 à l'eau recueillie à la partie supérieure de la salle des machines de l'Institut Pasteur, à environ 15 mètres au-dessus du sol et 20 mètres de la grande cheminée.

Elle a donné, trimestre par trimestre, les chiffres suivants. Ceux de la dernière colonne sont calculés en tenant compte de la surface (165 cent. carrés) de la section transversale à l'ouverture du cylindre.

	SULFATE de Ba pesé en grammes	SOUFRE correspondant en grammes	SOUFRE rapporté au mètre carré en grammes
Du 1 ^{er} mars au 31 mai 1931 . .	0,2737	0,0376	2,279
Du 1 ^{er} juin au 31 août 1931 . .	0,2105	0,0289	1,751
Du 1 ^{er} septembre au 30 novembre 1931	0,3352	0,0461	2,793
Du 1 ^{er} décembre 1931 au 29 février 1932	0,3370	0,0462	2,800
Du 1 ^{er} mars au 31 mai 1932 . .	0,2290	0,0315	1,909

Il est à présumer que ces chiffres sont parmi les plus forts que l'on puisse rencontrer, car l'endroit où l'eau avait été recueillie était placé au voisinage d'une cheminée émettrice de fumée et de gaz provenant de la combustion de la houille, substance qui renferme toujours, comme on sait, une assez forte proportion de pyrite.

Loin des villes, la proportion de soufre combiné contenu dans l'eau de pluie est beaucoup moins grande. Dans l'eau recueillie de la manière décrite plus haut, à l'Ecole d'Agriculture de Grignon pendant une année par M. le professeur Guérillot, j'ai trouvé seulement :

	SULFATE de Ba pesé en grammes	SOUFRE correspondant en grammes	SOUFRE rapporté au mètre carré [8] en grammes
Du 1 ^{er} mai 1934 au 30 avril 1935.	0,1480	0,00203	1,51

Cette proportion de soufre, équivalant à environ 2 milligr. 5 de soufre par litre, paraît, au premier abord, très petite. Elle est cependant loin d'être négligeable au point de vue agricole : on peut calculer, en effet [9] que si elle était complètement absorbée, elle suffirait à couvrir les besoins en soufre des récoltes de nos principales plantes cultivées.

La question se pose de savoir si dans certaines régions agricoles la proportion de soufre atmosphérique n'est pas inférieure à celle trouvée dans l'eau de pluie de Grignon. Comme il s'agirait alors de proportions très petites, de l'ordre de grandeur des erreurs d'expériences de la plupart des méthodes d'analyse

employées jusqu'ici, il faudrait évidemment tenir compte des observations que j'ai présentées plus haut pour obtenir une réponse précise à cette question.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *C. R. Ac. Agr.*, **21**, 1935, p. 775.
- [2] Redistillée sous le vide de la trompe à eau dans un appareil de verre.
- [3] Les évaporations ont été faites dans une partie du laboratoire où n'était dégagée aucune vapeur sulfurique.
- [4] C'est une cause d'erreur identique que j'ai signalée en 1907, à propos de l'analyse du caoutchouc. *Caoutchouc et Gutta-percha*, **4**, 1907, p. 1201.
- [5] BERTRAND (Gab.) et SILBERSTEIN (L.). *Ces Annales*, **50**, 1933, p. 344.
- [6] BERTRAND (Gab.) et SILBERSTEIN (L.). *Bull. Soc. chim.*, (4), **41**, 1927, p. 950 et **47**, 1920, p. 95.
- [7] Il va de soi que l'eau et les réactifs doivent être tout à fait purs; ceux qui ont été utilisés dans les expériences décrites ici ne donnaient, aux doses et dans les conditions énumérées, aucun précipité par le chlorure de baryum.
- [8] La section transversale du cylindre collecteur étant de 135 cent. carrés.
- [9] En se servant en particulier des résultats obtenus par BERTRAND (Gab.) et SILBERSTEIN (L.). *Bull. Soc. chim.* (4), **47**, 1930, p. 99, et par BERTRAND (Gab.) et GHITESCU (V.), *Comptes rendus*, **199**, 1934, p. 1219.

L'EAU LOURDE A-T-ELLE UNE ACTION SUR LES BACTÉRIES ?

Par R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et ÉTIENNE ROUX.

Dès que l'eau lourde (oxyde de deuterium) fut découverte, on chercha si elle était douée de propriétés biologiques spéciales (1). Certains auteurs lui reconnurent une action favorisante sur la culture de quelques organismes ; d'autres, au contraire, les plus nombreux, lui trouvèrent des propriétés abiotiques.

A la dilution de 1 p. 2.000, l'eau lourde favoriserait la poussée des Oscillaires, des moisissures parasites des Plannaires (E. J. Larson), de la levure *Saccharomyces cerevisiæ* (O. W. Richards) ; à 0,47 p. 100, elle a une action favorable sur la culture de *Aspergillus* (Samuel L. Meyer) ; à 0,54 p. 100 elle diminuerait l'action bactéricide du nitrate d'argent vis-à-vis de *B. pyocyaneus*, et surtout de *B. coli* (G. Lockemann et H. Leumig).

Des travaux, déjà nombreux, établissent que l'eau lourde gêne ou empêche la culture de nombreux organismes.

Gilbert N. Lewis (2) montra, en 1933, que l'eau lourde gêne ou inhibe, suivant la concentration, la germination des graines de tabac (*Nicotiana tabacum* var. *purpurea*). David L. Macht et Mary E. Davis constatèrent aussi une légère action inhibitrice de l'eau lourde sur les graines de lupin.

D'après T. Cunliffe Barnes, les filaments de Spirogyre (*Spirogyra nitida*) maintenus dans l'eau lourde diluée à 1/2000 perdent leur mobilité et ne se divisent plus.

E. Wellford Taylor et E. Newton Harley ont montré, qu'à partir d'une concentration à 45 p. 100, l'eau lourde inhibe la

⌘(1) Harold Clayton Vrey, le savant américain qui reçut, en 1934, le prix Nobel de Chimie pour la découverte du deuterium, s'intéressa dès le début aux propriétés biologiques de l'eau lourde.

(2) *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 55, 1933, p. 3503.

respiration des levures. Dans l'eau lourde à 98 p. 100 l'intensité respiratoire est diminuée de moitié. De même, la respiration et la luminescence des bactéries lumineuses marines sont très diminuées par l'eau lourde à une forte concentration.

H. S. Taylor, W. W. Swingle, H. Eyring et A. H. Frost (1) ont établi que l'eau lourde à 92 p. 100 est toxique pour certains organismes : têtards, planaires, paramécies, mais que ceux-ci peuvent vivre dans l'eau lourde à 30 p. 100 comme dans l'eau ordinaire.

Récemment, MM. L. Plantefol et G. Champetier (2) ont publié de très intéressantes études sur la germination du pollen et sur les phénomènes de reviviscence dans l'eau lourde.

Le choix du pollen (dans le cas particulier celui de *Narcissus papyraceus*) était heureux ; c'est un matériel très sensible puisqu'il germe dans l'eau pure.

Dans les dilutions d'eau lourde de 57 à 48 p. 100, le pollen germe. Le développement des tubes polliniques est toujours plus considérable à 48 p. 100 que dans l'eau ordinaire ; à 57 p. 100, il y a, suivant les lots de pollen, diminution nette ou amélioration.

L. Plantefol et G. Champetier ont vu que l'eau lourde à 98 p. 100 n'empêche pas les phénomènes de reviviscence qu'ils ont tentés sur des Tardigrades (*Macrobiotus macronyx*) et sur les Rotifères (*Rotifer vulgaris* et *Philodina roseola*). Ces résultats sont en opposition avec ceux obtenus par Harvey (3) qui avait constaté que *Philodina roseola* mourait en six à douze heures dans l'eau dense à 97 p. 100.

Il nous a paru intéressant de rechercher si l'eau lourde a une action favorable ou défavorable sur la culture des bactéries. Nous avons étudié à ce point de vue deux échantillons d'eau lourde, l'un à faible, l'autre à forte concentration.

(1) *Journ. Chem. Phys.*, 1, 1933, p. 751.

(2) *C. R. Acad. des Sciences*, 28 janvier 1935, p. 423-425 ; et *ibid.*, 11 février 1935, p. 587-589.

(3) *Biol. Bull.*, 66, 1934, p. 91.

I. — Eau lourde à faible concentration.

Nous avons utilisé pour ces expériences de l'eau lourde (oxyde de deuterium) à 0,46 mol. p. 100 (1). Nous avons pratiqué avec cet échantillon des essais *in vitro* et des expériences *in vivo*.

A. — EXPÉRIENCES *in vitro*.

1. *Analyse bactériologique*. — Nous avons tout d'abord cherché, par les procédés habituels, la présence de bactéries dans cet échantillon d'eau lourde. Nous n'avons trouvé ni *Bacterium coli*, ni bactéries putrides. Sur plaques de gélatine, les colonies microbiennes étaient nombreuses, mais provenaient de trois espèces seulement : du pneumobacille, une sarcine jaune non liquéfiante et quelques colonies d'une sarcine blanche liquéfiante.

L'eau n'ayant pas été transportée dans les conditions de température nécessaires pour éviter la multiplication des germes, cette analyse prouve seulement que certaines espèces bactériennes — peu nombreuses dans ce cas particulier — peuvent vivre pendant un temps assez long dans l'eau lourde — à 0,46 mol. p. 100.

B. — RECHERCHE DE L'ACTION FAVORISANTE.

Pour cette étude, nous avons préparé, dans des milieux de culture appropriés, deux séries de cultures : de *B. coli*, B. d'Eberth et paratyphiques, B. dysentérique, méningocoque, pneumocoque, streptocoque, *B. perfringens*. Les unes étaient additionnées de quantités progressivement croissantes d'eau lourde (de 1 goutte à 2 cent. cubes pour 5 cent. cubes de milieu de culture liquide), les autres ne recevaient pas d'eau lourde. Nous avons examiné les cultures d'heure en heure pour noter la série où la culture apparaîtrait en premier lieu. Nous

(1) Provenant de *The Ohio Chemical Co*, à Cleveland, Ohio, U.S.A.

avons aussi noté, par différence d'opacité, l'intensité de culture au bout de vingt-quatre heures. Nous avons vu que jamais la culture n'était favorisée par l'eau lourde, mais qu'au contraire, dans quelques cas, son développement était nettement entravé, comme nous allons maintenant l'indiquer.

C. — RECHERCHE DU POUVOIR EMPÊCHANT.

Nous avons cherché à préciser pendant combien de temps diverses bactéries (parmi les plus répandues) sont capables de survivre dans l'eau lourde. Nous avons employé la technique habituelle des repiquages, pratiqués au bout de temps variables de contact de l'émulsion microbienne avec la substance à l'étude. Dans des tubes, contenant chacun 5 cent. cubes d'eau lourde, nous mettions V gouttes d'une culture de vingt-quatre heures, en bouillon, ou d'une émulsion de culture sur gélose du germe choisi. Des repiquages, sur milieux appropriés, étaient pratiqués au bout de : cinq, dix, quinze, trente minutes, — une, cinq, dix, vingt-quatre heures, — puis tous les jours pendant vingt jours. Nous avons fait des essais comparatifs avec de l'eau distillée et avec de l'eau de source. Voici quelques résultats obtenus :

MICROBES	EAU DISTILLÉE	EAU DE SOURCE	EAU LOURDE
B. du colon	+ 20 ^e jour.	+ 20 ^e jour.	— 15 ^e jour.
B. Friedländer.	+ 20 ^e jour.	+ 20 ^e jour.	+ 20 ^e jour.
B. typhique	— 10 ^e jour.	+ 20 ^e jour.	— 10 ^e jour.
B. paratyphique A.	— 10 ^e jour.	+ 20 ^e jour.	— 15 ^e jour.
B. paratyphique B.	— 8 à 24 heures.	+ 20 ^e jour.	— 15 ^e jour.
B. Shiga	— 3 ^e jour.	— 15 ^e jour.	— 5 ^e jour.
<i>Proteus vulgaris</i>	+ 20 ^e jour.	+ 20 ^e jour.	+ 20 ^e jour.
Staphylocoque	+ 20 ^e jour.	+ 20 ^e jour.	— 5 ^e jour.
Streptocoque.	— 5 heures.	— 15 ^e jour.	— 5 ^e jour.
Méningocoque	— 5 minutes.	— 10 minutes.	— 5 minutes.
B. diphtérique	— 1 heure.	— 10 jours.	— 3 ^e jour.
<i>B. perfringens</i>	— 3 jours.	— 20 jours.	— 3 ^e jour.

+, veut dire culture au repiquage; —, pas de culture.

Sauf pour le *Proteus* et le B. Friedländer, les bactéries examinées ont vécu sensiblement moins longtemps dans l'eau lourde que dans l'eau de source. Pour un même microbe, le

temps de survie a été souvent intermédiaire entre celui noté pour l'eau distillée et celui trouvé pour l'eau de source (1).

Si on étudie comparativement l'action des rayons ultraviolets sur des émulsions bactériennes faites respectivement dans l'eau lourde, l'eau distillée et l'eau de source, on constate que c'est dans l'eau lourde que certains microbes, méningocoque, B. du côlon, streptocoque, sont le plus rapidement détruits.

L'échantillon d'eau lourde que nous avons examiné, ne contenait pas de bactériophage, mais n'empêchait pas l'action d'un bactériophage antishiga que nous avons préparé.

Ce même échantillon d'eau lourde s'est montré hémolytique pour les globules rouges d'homme ou de mouton au même titre que l'eau distillée. Une eau physiologique, salée à 9 p. 1.000 que nous avons préparée avec de l'eau lourde, possédait vis-à-vis des globules les mêmes propriétés que l'eau physiologique ordinaire.

Nous avons complété ces expériences *in vitro* par des expériences *in vivo*.

D. — EXPÉRIENCES « IN VIVO ».

Nous avons tout d'abord déterminé la toxicité de l'échantillon d'eau lourde sur lequel devaient porter nos expériences.

Des essais de toxicité ont déjà été pratiqués par divers auteurs. Lewis n'a pas réussi à tuer la souris en lui faisant absorber de l'eau lourde; même à dose élevée, il n'a observé que quelques signes légers d'intoxication. Macht et Davis ont pu injecter à la souris, par voie intraveineuse, de l'eau lourde à 1 p. 200, sans provoquer aucun accident.

On sait que récemment M. Klaus Hansen, professeur de Pharmacologie à Oslo, a pu absorber, sans ressentir aucun malaise, 10 grammes d'eau lourde à concentration élevée.

Dans nos expériences, des lapins de 3 kilogrammes à 3 kilogr. 500, ont pu en supporter 5 cent. cubes par voie intraveineuse ou intrapéritonéale et 8 cent. cubes par voie sous-

(1) Récemment, Jean Rostand, étudiant l'action de l'eau lourde sur la semence de grenouille, a montré que la survie des spermatozoïdes dans l'eau lourde à 99 p. 100, s'est montrée intermédiaire entre celle qu'ils manifestent dans l'eau distillée et celle qu'ils manifestent dans l'eau ordinaire. *C. R. Soc. Biol.*, 119, n° 16, 4 mai 1935, p. 31-32.

cutanée. Ces doses étaient sensiblement supérieures à celles qui nous étaient nécessaires pour préparer des émulsions microbiennes déterminant des infections mortelles.

Nous avons injecté à des lapins et à des cobayes des émulsions de *B. paratyphique B* en faisant varier les conditions de l'expérience. Un groupe recevait une émulsion de bacilles dans la veine, dans le péritoine ou sous la peau et, une heure après, une injection intraveineuse ou sous-cutanée de 2 à 3 cent. cubes d'eau lourde; — un autre groupe recevait d'abord de l'eau lourde et, une heure après, l'émulsion microbienne; — à un dernier groupe, on injectait un mélange d'eau lourde et de bacilles qui avaient été maintenu, pendant une heure, à l'étuve à 37°. Dans aucun cas, nous n'avons noté de protection contre le *B. paratyphique*. Au contraire, les animaux ayant reçu de l'eau lourde et des microbes (particulièrement par voie intraveineuse), mouraient avant les témoins qui n'avaient reçu que des microbes (ou que de l'eau lourde).

Nous avons pratiqué les mêmes essais avec des toxines diphtérique et tétanique. Nous n'avons noté ni protection contre ces toxines, ni accroissement de leur activité.

II. — Eau lourde à forte concentration.

Le deuxième échantillon était constitué par de l'eau lourde (1) à 99 grammes p. 100 grammes ($d. = 1.1050$).

A. Cet échantillon d'eau lourde, prélevé et conservé dans de bonnes conditions, s'est montré stérile. Semé sur divers milieux : bouillon, gélose ordinaire, gélose-ascite, gélose-sang, milieu de Dorset, gélatine, gélose Veillon (pour cultures anaérobies), il n'a donné lieu à aucune culture, même après dix jours de séjour à l'étuve à 37°.

B. Des expériences pratiquées dans les mêmes conditions que précédemment ont montré que cette eau lourde n'avait aucune propriété favorisante sur les cultures microbiennes.

C. Nous avons recherché si cet échantillon d'eau lourde

(1) Provenant de la « Norsk Hydro-Elektrisk Kvaelfstofaktieselskab », à Oslo.

avait des propriétés bactéricides et nous avons, pour cela, utilisé la technique des repiquages successifs que nous avons exposée plus haut. Cette fois encore, des essais comparatifs ont été pratiqués avec l'eau bidistillée et l'eau ordinaire (préalalement stérilisée par filtration à la bougie L3).

Nos essais ont porté sur les mêmes souches de microbes que dans l'essai précédent, mais nous avons plus particulièrement étudié le moment du « départ » des cultures. Afin de ne pas abaisser le titre de l'eau lourde en expérience, à laquelle nous ajoutons les émulsions microbiennes, nous avons fait ces émulsions en eau lourde du même titre. Le contact avec l'eau lourde, même prolongé pendant vingt-quatre heures, n'a pas détruit les microbes.

Il est à noter, cependant, que l'addition d'eau lourde *gêne la culture du streptocoque* qui finit par pousser, mais dont le développement subit un retard très net. Au bout de huit, dix, douze heures d'étuve à 37° (1), — alors que les microbes ayant été en contact avec l'eau bidistillée ou l'eau ordinaire poussent déjà très nettement dans un milieu liquide approprié — il n'y a aucune trace de culture dans les tubes contenant les streptocoques qui ont subi l'action de l'eau lourde.

L'addition d'eau lourde n'a modifié en rien le pouvoir pathogène des microbes que nous avons examinés. C'est ainsi que les cobayes inoculés avec un mélange de bacille diphtérique et d'eau lourde meurent dans les délais ordinaires et avec les lésions caractéristiques de l'intoxication diphtérique.

On peut donc conclure de ces recherches :

1° Les deux échantillons d'eau lourde que nous avons examinés, qui étaient d'origines différentes et de concentrations diverses (l'une faible et l'autre forte), ont montré une action semblable sur les bactéries que nous avons examinées. Ils avaient un pouvoir bactéricide nul ou très peu marqué suivant les microbes examinés et assez voisin de celui de l'eau distillée;

2° Injectée aux animaux d'expérience, l'eau lourde ne modifie en rien l'action des microbes pathogènes ou des toxines qui sont inoculés à ces animaux.

(1) Suivant les échantillons examinés et il serait intéressant d'étudier, à ce point de vue, un nombre élevé de souches de streptocoques.

**LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN
DANS LE SÉRUM
DÉBARRASSÉ DE LA FRACTION PRÉCIPITABLE
PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE**

par CH. AUGUSTE.

*(Institut Pasteur de Lille, Clinique médicale
et Clinique des maladies cutanées et syphilitiques
de l'hôpital Saint-Sauveur.)*

Nous avons signalé dans une communication récente [1] que la réaction de Bordet-Wassermann se montre beaucoup plus sensible lorsqu'on la recherche sur des sérums préalablement débarrassés de la fraction précipitable par l'acide chlorhydrique et nous avons proposé d'appliquer cette méthode dans la pratique du séro-diagnostic de la syphilis.

Le but de ce mémoire est de fournir l'explication de l'accroissement de sensibilité ainsi obtenu, de préciser notre technique et de comparer la valeur de notre méthode à celle des réactions de Kahn, de Vernes et de Hecht.

Nous commencerons par montrer que la fraction de sérum précipitable par l'acide chlorhydrique exerce un pouvoir inhibant qui s'oppose au pouvoir fixateur des éléments contenus dans le reste du sérum.

I. — Étude expérimentale du rôle de la fraction de sérum précipitable par l'acide chlorhydrique.

Au cours de recherches sur les propriétés des fractions de sérum humain correspondant aux deux chaînons de l'alexine nous avons eu l'idée de comparer les résultats obtenus en recherchant la réaction de Bordet-Wassermann dans le sérum entier, la fraction précipitable par l'acide chlorhydrique et le

reste du sérum d'un même individu. Nous avons opéré sur des sérums chauffés et des sérums non chauffés.

Nous exposerons en premier lieu les expériences faites sur des sérums chauffés qui sont de beaucoup les plus intéressantes.

1° EXPÉRIENCES FAITES SUR DES SÉRUMS CHAUFFÉS.

Technique.

Les sérums utilisés pour ces expériences ont été analysés le lendemain ou le surlendemain du prélèvement. Sauf indication contraire, le chauffage à 56° pendant trente minutes a été effectué avant la précipitation par l'acide chlorhydrique.

Fractionnement des sérums.

On commence par centrifuger le sérum pour le débarrasser complètement de ses éléments cellulaires, puis on l'additionne de 9 volumes d'acide chlorhydrique N/300. On agite et on abandonne le mélange pendant une heure à la température du laboratoire.

Fraction précipitable. — Le précipité recueilli après centrifugation est remis en suspension dans l'eau distillée et centrifugé à nouveau. Cette opération de lavage est répétée trois fois. L'eau distillée employée doit avoir un pH voisin de 6,5 valeur qui correspond approximativement à la réaction du milieu adopté pour la précipitation (1). Cette condition est nécessaire pour éviter la perte d'une partie du précipité par redissolution dans l'eau de lavage.

Le précipité lavé est ensuite trituré avec un volume (égal au volume initial de sérum utilisé) de solution de chlorure de sodium à 9 p. 100. L'emploi de cette concentration élevée permet d'obtenir rapidement une dissolution complète (Doladilhe) [2].

La solution de globulines ainsi préparée est additionnée de 9 volumes d'eau distillée; son pH est amené par addition de quelques gouttes de soude N/30 à une valeur d'environ 7,2 contrôlée à l'aide d'une gamme colorimétrique de phénolsulfonephthaléine. La liqueur obtenue est prête à servir à la recherche de la réaction de Bordet-Wassermann; elle renferme la fraction précipitable du sérum redissoute et diluée dix fois en milieu neutre et isotonique.

Fraction non précipitable. — Le liquide décanté après centrifugation est additionné du dixième de son volume de la solution :

Solution de soude N/30	40 cent. cubes.
Chlorure de sodium	8 gr. 9
Eau distillée, quantité suffisante pour	100 cent. cubes.

La réaction du mélange correspond pour la plupart des sérums à un pH d'environ 7,2; il est nécessaire de la contrôler en présence de phénolsulfonephthaléine et de ramener s'il y a lieu le pH à 7,2 par addition de quelques gouttes de soude ou d'acide chlorhydrique N/30.

La liqueur obtenue est prête à servir à la recherche de la réaction de Bordet-Wassermann; elle renferme la fraction non précipitable du sérum diluée onze fois en milieu neutre et isotonique.

(1) Voir p. 36.

Réaction de Bordet-Wassermann.

Toutes les réactions pratiquées sur le sérum entier ou les fractions du sérum d'un même individu sont faites le même jour avec la même émulsion d'antigène, la même alexine et les mêmes globules dans un milieu de pH 7,2. Le sérum entier est utilisé à la dose de 0 c. c. 3, les fractions précipitable et non précipitable sont employées respectivement aux doses de 3 et 3 c. c. 3 correspondant à 0 c. c. 3 de sérum.

Les conditions d'emploi de l'antigène, de l'alexine et des globules sensibilisés et la façon de lire les résultats sont celles que nous indiquons plus loin (voir p. 41).

Lorsqu'une réaction fortement positive s'accompagne d'absence d'hémolyse dans le tube renfermant la dose d'alexine la plus forte (suivant les cas 6 ou 8 unités) toutes les réactions faites sur le sérum correspondant sont recommencées simultanément en abaissant la quantité de sérum et en élevant les quantités d'alexine mises en œuvre, jusqu'à ce qu'il devienne possible de comparer avec exactitude les quantités maxima d'alexine qui peuvent être fixées par chacune des réactions.

Étude comparative de la réaction de Bordet-Wassermann dans le sérum entier, la fraction précipitable et la fraction non précipitable du sérum.

Nous avons recherché simultanément la réaction de Bordet-Wassermann dans le sérum entier, la fraction précipitable redissoute et la fraction non précipitable du sérum de 253 sujets comprenant 74 syphilitiques atteints de diverses formes de syphilis acquise ou héréditaire, récente ou ancienne, traitée ou non traitée; 151 malades divers non syphilitiques et 28 sujets normaux.

Le tableau I indique le nombre de résultats positifs obtenus pour chacune des réactions étudiées. Le tableau II rassemble une trentaine d'exemples permettant de comparer les quantités d'alexine fixées par chacune des réactions pratiquées sur le sérum d'un même individu. Le tableau III permet de comparer les résultats observés pour l'ensemble des sérums examinés.

TABLEAU I. — Nombre de résultats positifs.

	SÉRUM ENTIER	FRACTION précipitable	FRACTION non précipitable
	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
28 sujets normaux.			
151 malades non syphilitiques. . .	0	18, soit 12 p. 100	0
74 syphilitiques . .	31, soit 41,8 p. 100	22, soit 29,7 p. 100	54, soit 72,9 p. 100

TABLEAU II. — Tableau comparatif des unités d'alexine fixées pour chacune des réactions pratiquées pour 30 des sujets étudiés.

OBSERVATION numéro	AGE	SEXE	DIAGNOSTIC	SÉRUM ENTIER	FRACTION précipitable	FRACTION non précipitable
<i>Exemples de sujets non syphilitiques :</i>						
91	22	M.	Sujet normal.	0	0	0
102	23	F.	Tuberculose pulmonaire latente. Bon état état général. Psoriasis.	0	0	0
133	33	F.	Tuberculose pulmonaire évolutive. Phlébie avancée	0	1	0
148	49	M.	Pleurésie sérofibrineuse tuberculeuse	0	1	0
1.430	28	F.	Purpura infectieux.	0	0	0
1.406	39	M.	Leucémie myéloïde	0	0	0
175	45	M.	Néphrite albuminurique avec urémie con- firmée	0	0	0
208	49	F.	Diabète avec dénutrition.	0	0	0
1.409	28	M.	Orchite blennorragique.	0	1	0
210	22	F.	Lupus de la face.	0	0	0
118	45	M.	Gale infectée.	0	0	0
1.412	51	F.	Eczéma	0	1	0
<i>Exemples de sujets syphilitiques :</i>						
218	41	M.	Hérédosyphilis. Retard de développement.	0	0	3
145	45	M.	Antécédents d'hérédosyphilis. Bon état général.	0	0	0
216	26	M.	Chancres pénétrants (présence de tréponèmes).	0	0	3
1.415	48	F.	Syphilides périanales.	3	2	5
1.425	28	F.	Syphilides palpucrocrouteuses de la face	3	1	10
200	35	M.	Antécédents de chancre en 1930. Traité. Pas d'accidents actuels.	1	0	7
155	40	M.	Antécédents de chancre en 1922. Peu traité. Pas d'accidents actuels.	2	0	9
109	52	M.	Antécédents de chancre en 1914. Traité. Pas d'accidents actuels.	0	0	0
43	39	F.	Gomme syphilitique du nez	5	2	6
137	43	M.	Syphilis ancienne. Zona	0	0	7
100	35	F.	Syphilis ancienne. Grossesse	0	0	4
1.399	48	M.	Syphilis ancienne. Syndrome de Raynaud	0	0	3
1.395	56	M.	Gommes syphilitiques multiples.	4	1	6
95	42	M.	Syphilis ancienne et tuberculose pulmo- naire.	0	1	2
159	55	M.	Aortite syphilitique	1	0	4
198	70	M.	Artérite syphilitique du membre inférieur.	3	6	10
222	48	M.	Tabès	0	0	6
207	42	M.	Paralysie générale.	3	0	11

TABLEAU III. — Tableau comparatif des résultats observés pour l'ensemble des 253 sérums étudiés.

	FRACTION précipitable	FRACTION non précipitable
1° 28 sujets normaux présentant une réaction <i>négative</i> dans le sérum entier :		
Nombre des réactions positives. . . .	0	0
2° 151 malades non syphilitiques présentant une réaction <i>négative</i> dans le sérum entier :		
Nombre des réactions positives. . . .	18, soit 12 p. 100	0
Sommes des unités d'alexine fixées (1).	18	0
3° 43 syphilitiques présentant une réaction <i>négative</i> dans le sérum entier :		
Nombre des réactions positives. . . .	2, soit 4,6 p. 100	23, soit 53 p. 100
Sommes des unités d'alexine fixées (1).	2	98
4° 31 syphilitiques présentant une réaction <i>positive</i> dans le sérum entier (somme des unités d'alexine fixées : 94) :		
Nombre des réactions positives. . . .	20, soit 64,6 p. 100	31, soit 100 p. 100
Sommes des unités d'alexine fixées (1).	66	284

Voici ce que nous avons constaté :

- 1° La réaction pratiquée sur le sérum entier s'est montrée :
Négative chez tous les sujets normaux et malades non syphilitiques et chez 58,2 p. 100 des syphilitiques;
Positive chez 41,8 p. 100 des syphilitiques.
 2° La réaction pratiquée sur la fraction précipitable redissoute s'est montrée :

Négative chez tous les sujets normaux, chez 88 p. 100 des non syphilitiques et chez 95,4 p. 100 des syphilitiques présentant une réaction *négative* dans le sérum entier ainsi que chez 36 p. 100 des syphilitiques présentant une réaction *positive* dans le sérum entier.

Positive chez 12 p. 100 des sujets non syphilitiques et chez 4,6 p. 100 des syphilitiques présentant une réaction *négative* dans le sérum entier, ainsi que chez 64 p. 100 des syphilitiques présentant une réaction *positive* dans le sérum entier. Dans ce

(1) Pour l'ensemble des réactions positives.

dernier cas, l'intensité de la réaction pratiquée sur la fraction précipitable était souvent beaucoup plus faible et quelquefois un peu plus forte que pour le sérum entier.

Le pouvoir anticomplémentaire de cette fraction varie suivant les sérums; il est parfois inférieur et plus souvent supérieur à celui d'une dose équivalente de sérum entier; il n'est jamais assez fort pour empêcher la lecture des résultats de la réaction de fixation.

3° *La réaction pratiquée sur la fraction non précipitable* s'est montrée :

Négative chez tous les sujets normaux et malades non syphilitiques et chez 47 p. 100 des syphilitiques présentant une réaction *négative* dans le sérum entier;

Positive chez 53 p. 100 des syphilitiques présentant une réaction *négative* dans le sérum entier et chez tous les syphilitiques présentant une réaction *positive* dans le sérum entier. Dans ce dernier cas, l'intensité de la réaction pratiquée sur la fraction non précipitable n'a jamais été moins forte que pour le sérum entier; elle a été trouvée souvent trois ou quatre et parfois cinq ou six fois plus forte.

Le pouvoir anticomplémentaire de cette fraction est à peu près le même pour tous les sérums, il est toujours nettement inférieur à celui d'une dose équivalente de sérum entier.

Ces constatations peuvent se résumer de la façon suivante :

1° *La réaction pratiquée sur la fraction précipitable redissoute* a fourni 12 p. 100 de résultats positifs chez les non syphilitiques et 29,7 p. 100 chez les syphilitiques. Elle a donc fait preuve :

D'une spécificité inférieure à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier qui est demeurée négative chez tous les sujets non syphilitiques;

D'une sensibilité nettement inférieure à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier qui s'est montrée positive chez 44,8 p. 100 des syphilitiques;

2° *La réaction pratiquée sur la fraction non précipitable* est demeurée négative chez tous les sujets non syphilitiques; elle a fourni 72,9 p. 100 de résultats positifs chez les syphilitiques.

Elle a donc fait preuve d'une *spécificité égale* et d'une *sensibilité nettement supérieure* à celles de la réaction pratiquée sur le sérum entier.

*Influence de la fraction précipitable redissoute
introduite dans la réaction
pratiquée sur la fraction non précipitable du sérum.*

Il ressort des expériences que nous venons d'exposer que l'élimination de la fraction de sérum précipitable par l'acide chlorhydrique augmente la sensibilité de la réaction de Bordet-Wassermann. Cette constatation permettait de supposer que la présence des éléments précipitables exerce une influence perturbatrice susceptible de diminuer la sensibilité de cette réaction.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé pour 18 sérums syphilitiques et 17 sérums non syphilitiques les résultats de la réaction pratiquée : 1° sur la fraction non précipitable seule, et 2° sur la fraction non précipitable additionnée de fraction précipitable redissoute. Ces expériences ont été conduites de la façon suivante :

La réaction a été recherchée simultanément dans le sérum entier fournissant la fraction non précipitable, le sérum entier fournissant la fraction précipitable, la fraction non précipitable seule, la fraction précipitable seule et le mélange fraction non précipitable + fraction précipitable.

L'origine de la fraction précipitable introduite dans la réaction varie selon les expériences; tantôt elle provient du sérum qui a fourni la fraction non précipitable; tantôt elle provient d'un sérum étranger syphilitique ou non syphilitique.

Le mode d'introduction de la réaction précipitable varie suivant les expériences; tantôt elle a été ajoutée à la fraction non précipitable et à l'antigène en même temps que l'alexine, tantôt elle a été laissée en contact pendant une heure à 37° soit avec la fraction non précipitable soit avec l'antigène avant l'addition des autres réactifs.

La quantité de fraction précipitable mise en œuvre correspond dans tous les cas à la quantité de sérum utilisée dans la réaction pratiquée sur le sérum entier.

Le tableau IV rassemble quelques exemples de ces expériences. Le tableau V récapitule les résultats observés pour l'ensemble des sérums étudiés.

TABLEAU IV. — Tableau comparatif des unités d'alexine
fixées par les réactions pratiquées sur le sérum de 6 sujets.

OBSERVATION numéro	SÉRUM fournissant la fraction non précipitable		SÉRUM fournissant la fraction précipitable		FRACTION non précipitable seule	FRACTION précipitable seule	FRACTION non précipitable + fraction précipitable
	Origine	Sérum entier	Origine	Sérum entier			
94	Sujet normal.	0	Même sérum.	0	0	0	0
133	Tuberculeux non syphilitique.	0	Même sérum.	0	0	1	0
1.399	Syphilis nerveuse.	0	Même sérum.	0	3	0	0
1.399	Syphilis nerveuse.	0	Sérum étranger normal.	0	3	0	0
1.399	Syphilis nerveuse.	0	Sérum étranger tuberculeux.	0	3	0	0
1.418	Aortite syphilitique.	1	Même sérum.	1	7	2	1
1.418	Aortite syphilitique.	1	Sérum étranger normal.	0	7	0	1
1.418	Aortite syphilitique.	1	Sérum étranger syphilitique.	0	7	0	1
183	Gomme syphilitique.	0	Même sérum.	0	4	0	1
183	Gomme syphilitique.	0	Sérum étranger (eczéma).	0	4	0	0
1.352	Syphilides palmaires.	3	Même sérum.	3	11	2	3
1.352	Syphilides palmaires.	3	Sérum étranger (psoriasis).	0	11	0	3

TABLEAU V. — Tableau récapitulatif
de l'ensemble des résultats observés pour les 35 sérums étudiés.

	SÉRUM entier	FRACTION non précipitable	
		seule	additionnée de fraction précipitable
1° 17 sujets non syphilitiques :	—	—	—
Nombre de réactions positives	0	0	0
2° 18 sujets syphilitiques :			
Nombre de réactions positives	8	13	8
Sommes des unités d'alexine fixées (1). 21	21	95	23

Il résulte de nos constatations que l'introduction de la fraction précipitable redissoute a pour effet de rendre négatifs les résultats positifs obtenus pour des syphilitiques dont la réaction est négative dans le sérum entier;

De diminuer l'intensité des résultats positifs obtenus pour des syphilitiques dont la réaction est positive dans le sérum entier. Dans le dernier cas, l'intensité de la réaction obtenue sur le

(1) Pour l'ensemble des réactions positives.

mélange fraction non précipitable + fraction précipitable redissoute est à peu près égale à celle de la réaction obtenue sur le sérum entier.

Les réactions négatives obtenues sur la fraction non précipitable de sérums non syphilitiques demeurent négatives en présence de fraction précipitable redissoute.

Le moment choisi pour l'introduction et l'origine de la fraction précipitable introduite sont sans influence particulière sur les réactions. Les résultats restent à peu près les mêmes lorsque la fraction précipitable est introduite avant ou en même temps que l'alexine, lorsqu'elle provient du sérum fournissant la fraction non précipitable ou d'un sérum étranger syphilitique ou non syphilitique.

Le pouvoir anticomplémentaire du mélange fraction précipitable + fraction non précipitable équivaut approximativement à celui du sérum entier; il est généralement inférieur à la somme des pouvoirs anticomplémentaires manifestés séparément par chacune des fractions étudiées.

La conclusion de ces expériences est que la sensibilité de la réaction pratiquée sur le mélange fraction non précipitable + fraction précipitable redissoute est notablement inférieure à celle de la réaction pratiquée sur la fraction non précipitable seule et sensiblement égale à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier.

Discussion.

Nous envisagerons séparément les constatations faites pour chacune des fractions de sérum étudiées en commençant par préciser la composition et l'état physique des éléments qu'elle contient.

Fraction précipitable par l'acide chlorhydrique.

La fraction de sérum précipitable par l'acide chlorhydrique suivant la technique que nous avons indiquée comprend :

1° *Des euglobulines* facilement précipitables représentant une très faible partie des globulines totales. Cette portion du précipité se présente sous l'aspect d'une poudre blanche facilement soluble dans l'eau salée physiologique. Elle corres-

pond approximativement à la « labilglobuline » de Stern [3].

2° Une proportion plus ou moins importante d'une *lipoprotéine* phosphorée et cholestérinée, gélatineuse, légèrement colorée, dont l'aspect est nettement différent de celui des globulines. Cette lipoprotéine se dissout lentement et imparfaitement dans l'eau physiologique ; elle se dissout rapidement et complètement dans les solutions concentrées de chlorure de sodium (Doladilhe) [2].

La même fraction redissoute suivant la technique que nous avons indiquée se présente sous l'aspect d'une liqueur plus ou moins louche qui n'est jamais aussi limpide que le sérum correspondant, ce qui indique visiblement que les éléments redissous se trouvent dans un état physique différent de celui qu'ils avaient avant la précipitation.

Cette altération de l'état physique des éléments redissous est peut-être la cause de l'irrégularité des résultats d'expérience observés sur la fraction précipitable du sérum.

Nous avons constaté en effet que cette fraction manifeste un pouvoir anticomplémentaire très variable, parfois supérieur à celui du sérum entier. Son pouvoir fixateur en présence d'antigène lipoidique est assez inconstant et parfois sans rapport avec celui du sérum entier ; il se traduit chez certains sujets non syphilitiques par une réaction faiblement positive et chez certains sujets syphilitiques par une réaction très différente de celle du sérum entier. Il est donc prudent de formuler quelques réserves sur la validité des conclusions qui peuvent être tirées de cette catégorie d'expériences.

L'ensemble des résultats observés indique cependant avec netteté que la sensibilité de la réaction pratiquée sur la fraction précipitable est notablement inférieure à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier. Nous montrerons plus loin que cette indication concorde avec les conclusions tirées d'autres expériences faites sur la fraction non précipitable du sérum.

Fraction non précipitable par l'acide chlorhydrique.

Cette fraction comprend tous les éléments autres que les euglobulines et la lipoprotéine précipitables par l'acide chlorhy-

drique; elle renferme notamment la majeure partie des globulines totales. Son état physique ne paraît pas modifié et elle conserve dans tous les cas une limpidité équivalente à celle du sérum entier.

Les expériences faites sur cette fraction de sérum se sont montrées beaucoup plus concluantes que les précédentes. Les résultats observés ont fait preuve d'une netteté et d'une régularité remarquables et dans tous les cas étudiés la fraction non précipitable a manifesté un pouvoir anticomplémentaire inférieur et un pouvoir fixateur spécifique supérieur ou égal à celui du sérum entier.

L'ensemble de ces expériences permet d'affirmer que la réaction de Bordet-Wassermann pratiquée sur la fraction non précipitable du sérum possède une spécificité égale et une sensibilité très supérieure à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier. En d'autres termes, ces recherches démontrent que la *sensibilité diminue ou augmente suivant que la fraction précipitable intervient ou n'intervient pas dans la réaction*.

La seule hypothèse qui permette d'expliquer ce phénomène est d'admettre que la *fraction précipitable exerce une influence inhibante* sur la réaction de Bordet-Wassermann. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par les expériences faites sur le mélange fraction non précipitable + fraction précipitable redisoute. Ces recherches montrent :

1° Que la présence des éléments précipitables par l'acide chlorhydrique exerce une action inhibante sur la réaction de Bordet-Wassermann puisque la sensibilité de la réaction pratiquée sur le sérum reconstitué par la réunion des deux fractions est notablement inférieure à celle de la réaction pratiquée sur la fraction non précipitable seule et sensiblement égale à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier;

2° Que cette action inhibante n'a pas de caractère spécifique puisqu'elle peut être exercée indifféremment par la fraction précipitable de n'importe quel sérum syphilitique ou non syphilitique.

Les réserves précédemment formulées à propos des expériences faites sur la fraction précipitable seule ne semblent pas applicables aux expériences faites sur le mélange des deux fractions de sérum. Nous avons constaté en effet que les ano-

malies de pouvoir complémentaire ou de pouvoir fixateur attribuables à l'altération de l'état physique des éléments redissous disparaissent ou s'atténuent considérablement en présence du reste du sérum.

Remarquons enfin que l'indication fournie par les expériences faites sur la fraction précipitable seule se montre favorable à l'hypothèse que nous venons d'émettre puisque la réaction pratiquée sur les éléments précipités redissous fait preuve d'une sensibilité nettement inférieure à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier.

En résumé, il résulte de nos expériences que *la réaction de Bordet-Wassermann pratiquée sur le sérum entier dépend simultanément du pouvoir fixateur de la fraction non précipitable et du pouvoir inhibant de la fraction précipitable par l'acide chlorhydrique.*

Le pouvoir fixateur de la fraction non précipitable est spécifique; il fait défaut chez les sujets non syphilitiques. Le pouvoir inhibant de la fraction précipitable n'est pas spécifique, il existe indifféremment chez les sujets syphilitiques ou non syphilitiques.

La réaction pratiquée sur le sérum entier d'un sujet syphilitique est positive lorsque le pouvoir fixateur de la fraction non précipitable dépasse le pouvoir inhibant de la fraction précipitable; elle est négative dans le cas contraire.

Est-il possible de pousser plus loin l'analyse et de déterminer quels sont les constituants du sérum qui interviennent dans le pouvoir fixateur manifesté par la fraction non précipitable et le pouvoir inhibant manifesté par la fraction précipitable?

Les faits expérimentaux que nous avons observés ne permettent pas de choisir entre les nombreuses hypothèses qu'on peut envisager pour répondre à cette question. Nous ignorons quels peuvent être les rôles respectifs des englobulines et de la lipoprotéine précipitables par l'acide chlorhydrique. Nous ne savons même pas qu'elle est exactement la répartition des éléments fixateurs et des éléments inhibants entre les deux fractions de sérum que nous avons étudiées.

Le précipité obtenu en additionnant uniformément tous les sérums d'une même quantité d'acide chlorhydrique N/300 n'a pas une composition chimique définie. L'abondance de la

précipitation, la nature des éléments entraînés peuvent varier dans des conditions telles qu'il paraît improbable que pareille méthode de fractionnement permette de séparer complètement dans tous les cas les éléments doués de pouvoirs antagonistes. Il n'est pas invraisemblable de supposer que la fraction non précipitable peut renfermer des éléments inhibants dissimulés par l'influence prépondérante des éléments fixateurs de même que la fraction précipitable peut renfermer des éléments fixateurs dissimulés par l'influence prépondérante des éléments inhibants.

Le seul fait certain est que la précipitation par l'acide chlorhydrique fournit un moyen commode de débarrasser grossièrement le sérum d'éléments inhibants qui diminuent la sensibilité de la réaction de Bordet-Wassermann.

Les conclusions que nous venons d'exposer ne contredisent nullement celles des auteurs qui ont étudié avant nous le rôle de diverses fractions du sérum dans la réaction de Bordet-Wassermann.

Nous n'entreprendrons pas d'exposer ici les très nombreux travaux parus sur ce sujet depuis près de trente ans et nous nous bornerons à indiquer brièvement les faits expérimentaux qui se dégagent de l'ensemble des publications consacrées au rôle des globulines.

Le fait le plus net a été observé par les auteurs qui ont précipité la totalité des globulines au moyen de la dialyse (Kopaczewski [4], Forszman [5], Kapsenberg [9]), de l'électrodialyse (Ruppel et Ornstein [6], Stern [3]) ou du sulfate d'ammoniaque demi-saturé (Friedeman [7], Schmidt [8], Kapsenberg [9], Weisbach [10], Freund et Lustig [11]). Tous ces auteurs s'accordent à reconnaître que la précipitation totale des globulines entraîne la totalité des éléments doués d'un pouvoir fixateur. Kapsenberg, Forszman et Stern ont clairement démontré que la fraction des albumines ne joue aucun rôle et que toutes les substances qui interviennent dans la réaction appartiennent à la fraction des globulines.

Les faits observés par les auteurs qui n'ont précipité qu'une partie des globulines au moyen de l'acide carbonique (Salta et Donati [12], Duhot [13], Renaux [14], Mandelbaum [15], Sahlmann [16], Mackie [17], Stern [3]) ou de l'acide chlorhy-

drique (Gloor et Klinger [18], Sachs [19], Felke [20]) sont déjà moins nets. Leurs recherches permettent de conclure que la précipitation partielle des globulines entraîne une proportion plus ou moins grande d'éléments doués d'un pouvoir fixateur, mais elles n'apportent aucune précision sur l'importance de la fraction ainsi entraînée. La majorité des auteurs (Duhot, Renaux, Sahlmann, Sachs, Gloor et Klinger, Felke) tend à admettre que les éléments qui demeurent dans le reste du sérum sont les plus actifs, mais d'autres auteurs (Salta et Donati, Mackie) soutiennent l'opinion contraire et les faits publiés ne sont pas absolument concluants.

Les faits observés par les auteurs qui ont étudié isolément diverses fractions des euglobulines et des pseudoglobulines sont encore moins nets. Mackie et Stern soutiennent que les éléments fixateurs sont liés aux euglobulines, Freund et Lustig affirment qu'ils sont liés aux sous-fractions des euglobulines et des pseudoglobulines solubles dans l'eau salée et l'eau carbonatée. Aucune conclusion ne peut être actuellement tirée de ces recherches.

Les autres travaux effectués sur le rôle des globulines n'ont apporté que des faits négatifs ou douteux. Les recherches basées sur l'étude de la teneur en globulines des sérums syphilitiques (Noguchi [21], Bircher et Farland [22], Holker [23], Gaté, Gardère et Badinand [24]) ont abouti à cette conclusion que la réaction de Bordet-Wassermann ne dépend pas de la quantité de globulines présente dans le sérum. Les recherches effectuées sur des sérums débarrassés de leurs lipoides ont montré que les éléments fixateurs entraînés par la précipitation des globulines ne sont pas des lipoides (Wolf et Ridael [25]).

En résumé, le seul fait certain qui se dégage des publications que nous avons pu recueillir est que la précipitation des globulines par le sulfate d'ammoniaque demi-saturé, la dialyse ou l'électrodialyse entraîne la totalité des éléments qui permettent de différencier un sérum syphilitique d'un sérum non syphilitique par la réaction de Bordet-Wassermann.

Ce court aperçu des travaux antérieurs suffit à montrer que nos recherches ne font que confirmer sur certains points et compléter sur d'autres points les données déjà établies par d'autres auteurs.

1° Nos expériences confirment que la majeure partie des éléments doués d'un pouvoir fixateur spécifique ne sont pas précipitables par l'acide chlorhydrique ainsi que l'avaient déjà signalé Gloor et Klinger [18] et Felke [20].

Rappelons que Kapsenberg, Forszman et Stern ont démontré que les mêmes éléments sont totalement précipitables par toutes les méthodes capables de précipiter la totalité des globulines. D'où l'on peut conclure que les éléments doués d'un pouvoir fixateur spécifique sont liés à la fraction des globulines totales qui n'est pas précipitable par l'acide chlorhydrique.

2° Nos expériences montrent que la fraction des globulines précipitables par l'acide chlorhydrique exerce un pouvoir inhibant non spécifique qui n'avait pas encore été signalé. Remarquons que ce pouvoir inhibant s'oppose au pouvoir fixateur spécifique que nous venons d'attribuer aux globulines non précipitables ; il s'agit, par conséquent, d'un antagonisme qui oppose entre elles deux fractions des globulines totales.

L'antagonisme ainsi défini est différent de ceux qui ont été antérieurement envisagés par d'autres auteurs. Rappelons notamment que Felke [20] a attribué aux globulines du sérum de cobaye le pouvoir d'inhiber la réaction de Bordet-Wassermann et que Friedeman [7] et Schmidt [8] ont admis l'existence d'un antagonisme opposant la fraction des albumines douée d'un pouvoir inhibant à la fraction des globulines totales douée d'un pouvoir fixateur spécifique.

Mackie [17] a signalé, à propos de la réaction de Sachs et Georgi un antagonisme opposant l'englobuline (précipitable par l'acide carbonique) douée d'un pouvoir inhibant et la pseudoglobuline douée du pouvoir floculant spécifique. Cette opinion est intéressante à rapprocher de celle que nous soutenons à propos de la réaction de Bordet-Wassermann.

2° EXPÉRIENCES FAITES SUR DES SÉRUMS NON CHAUFFÉS.

Nous nous sommes demandé s'il était possible d'utiliser des fractions de sérum non chauffé pour le séro-diagnostic de la syphilis par la réaction de fixation. Pour répondre à cette question, nous avons recherché pour 126 sérums non chauffés le pouvoir anticomplémentaire et le pouvoir fixateur en présence

d'antigène lipoïdique de chacune des fractions précipitable et non précipitable par l'acide chlorhydrique.

Les sérums ainsi étudiés ont été prélevés à la veille de l'analyse chez 15 sujets normaux, 18 tuberculeux, 35 syphilitiques et 58 malades atteints d'affections diverses.

Technique.

La technique suivie pour ces recherches est analogue à celle que nous avons précédemment indiquée pour les expériences faites sur des sérums chauffés. La seule différence est que nous employons 12 volumes au lieu de 9 volumes d'acide chlorhydrique N/300 pour précipiter les sérums.

Cette modification de technique nous est imposée par la raison suivante : l'étude du pouvoir anticomplémentaire et du pouvoir fixateur exige que les fractions de sérum analysées soient complètement privées de pouvoir alexique. Il est donc nécessaire de choisir une technique de fractionnement qui assure une séparation complète des deux chaînons de l'alexine humaine.

Après divers essais, nous avons reconnu que la précipitation du sérum par 9 volumes d'acide chlorhydrique N/300 n'entraîne qu'une partie du chaînon moyen. L'autre partie demeure mélangée au chaînon terminal (fraction non précipitée) qui conserve de ce fait un pouvoir alexique assez notable. Il n'en est plus de même lorsqu'on élève la proportion d'acide chlorhydrique employée à 12 volumes, la précipitation entraîne la totalité du chaînon moyen et la fraction non précipitée ne conserve aucun pouvoir alexique.

Les procédés employés pour redissoudre la fraction précipitée et pour rendre la fraction non précipitée neutre et isotonique sont identiques à ceux que nous avons appliqués pour les fractions de sérums chauffés.

Les fractions ainsi obtenues ont été employées dans tous les cas à des doses correspondant à 0 c. c. 15 de sérum entier ; pour certaines expériences, elles ont été chauffées pendant trente minutes à température constante entre 40 et 56°.

Pouvoir anticomplémentaire.

Nous avons constaté que :

1° La fraction non précipitable est fortement anticomplémentaire chez tous les sujets sains ou malades. La quantité d'alexine fixée varie suivant les individus de 4 à 8 unités.

Le pouvoir anticomplémentaire de cette fraction diminue lorsqu'on la chauffe au-dessus de 50° ; il disparaît presque totalement lorsque la température de chauffage atteint 56°.

2° La fraction précipitable redissoute manifeste un pouvoir anticomplémentaire très variable suivant les individus. La quantité d'alexine fixée est nulle ou inférieure à l'unité dans 15 cas, comprise entre 1 et 3 dans 58 cas et supérieure à 3 dans les autres cas.

Aucun rapport particulier n'apparaît entre la nature de la maladie et le pouvoir anticomplémentaire de la fraction précipitable. La seule remarque qu'il soit possible de faire est que ce pouvoir est généralement faible chez les malades en état de dénutrition.

Réaction de fixation.

Le pouvoir fixateur exercé par la fraction non précipitable en présence d'antigène lipoidique n'a pu être déterminé dans aucun cas par suite de l'élévation du pouvoir anticomplémentaire qui rend complètement impossible la lecture des résultats de la réaction de fixation.

Le pouvoir fixateur exercé par la fraction précipitable redissoute a pu être déterminé dans tous les cas où le pouvoir anticomplémentaire de cette fraction correspondait à moins de 3 unités d'alexine. Il en était ainsi chez 73 sujets comprenant 2 individus normaux, 15 tuberculeux, 18 syphilitiques et 38 malades divers.

Nous avons obtenu dans ces conditions une réaction de fixation positive :

1° Chez 11 syphilitiques présentant une réaction de Bordet-Wassermann positive dans le sérum entier chauffé ;

2° Chez 4 syphilitiques sur 7 présentant une réaction de Bordet-Wassermann négative dans le sérum entier chauffé ;

3° Chez 13 tuberculeux et 11 malades divers cliniquement indemnes de syphilis présentant une réaction de Bordet-Wassermann négative dans le sérum entier chauffé.

Nous n'insisterons pas longuement sur l'interprétation de ces expériences qui montrent clairement que les fractions extraites d'un sérum non chauffé ne peuvent être utilisées pour le séro-diagnostic de la syphilis par la réaction de fixation. La lecture des résultats est toujours impossible lorsqu'on opère sur la fraction non précipitable; elle est tantôt impossible et tantôt possible lorsqu'on opère sur la fraction précipitable, mais les résultats positifs ainsi observés n'ont aucune valeur spécifique.

Les recherches antérieures effectuées par Friedeman [7], Mandelbaum [15], Rubinstein [26], Forszmann [5], sur des globulines de sérums humains négatifs, par Gloor et Klinger [18] sur des globulines de sérums humains rendus artificiellement positifs, par Bory [27] et Means [28] sur des globulines de sérums animaux avaient déjà montré que les globulines d'un sérum non chauffé peuvent fixer l'alexine en présence d'antigène lipoidique sans que la syphilis soit en cause. Toutes les fractions des globulines précipitables par les différents réactifs possèdent ce pouvoir qui disparaît sous l'influence d'un chauffage à 55° pendant trente minutes.

Certains auteurs ont considéré que cette propriété commune aux globulines des sérums actifs d'homme ou d'animal était une preuve de l'importance du rôle joué par les globulines dans la réaction de Bordet-Wassermann. Cette interprétation est manifestement inexacte et il est à peine besoin de faire remarquer qu'une propriété thermolabile des globulines ne peut être invoquée pour expliquer le mécanisme d'une réaction qui se pratique exclusivement sur du sérum chauffé.

La seule conclusion qu'on puisse tirer de ces résultats d'expériences est que les globulines jouent un rôle essentiel dans les réactions non spécifiques auxquelles on s'expose en pratiquant la réaction de fixation sur un sérum non chauffé, c'est-à-dire dans des conditions différentes de celles de la réaction de Bordet-Wassermann.

11. — Technique de la réaction de Bordet-Wassermann dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable par l'acide chlorhydrique.

Les conclusions de nos expériences sur le rôle inhibant de la fraction précipitable par l'acide chlorhydrique nous ont engagé à étudier la possibilité d'appliquer dans la pratique courante du séro-diagnostic de la syphilis le procédé que nous avons utilisé pour pratiquer la réaction de Bordet-Wassermann sur la fraction non précipitable des sérums chauffés.

Nous avons recherché pour chacun des temps opératoires les conditions d'expériences qui présentent le plus de garanties pour l'exactitude des résultats et le plus d'avantages pour la commodité des manipulations.

Élimination de la fraction précipitable.

La première question que nous avons examinée a été de déterminer quels sont le titre et la quantité d'acide chlorhydrique les plus avantageux à employer pour précipiter le sérum. Nous avons étudié l'influence de ces 2 facteurs sur l'abondance de la précipitation et la sensibilité de la réaction de Bordet-Wassermann.

88 sérums dont 45 syphilitiques ont été précipités simultanément par plusieurs procédés différents : addition de 8, 9, 10 ou 11 volumes d'acide chlorhydrique N/250 ou N/300.

L'abondance des fractions précipitées a été évaluée en prenant pour base la densité optique du milieu, mesurée à l'aide du photomètre de Vernes, Bricq et Yvon. La réaction de Bordet-Wassermann a été pratiquée sur les fractions non précipitables suivant la technique précédemment indiquée.

Nous avons constaté que :

1° L'abondance de la précipitation varie suivant les sérums lorsqu'on emploie un titre et une quantité fixes d'acide chlorhydrique ; elle varie aussi pour un même sérum suivant le titre et la quantité d'acide utilisés.

La précipitation la plus abondante correspond pour la majo-

rité des sérums à l'addition de 10 volumes d'acide chlorhydrique N/300 ou 9 volumes d'acide N/250.

La précipitation obtenue par addition des 9 volumes d'acide chlorhydrique N/300 utilisés pour nos recherches reste généralement incomplète et n'entraîne qu'une fraction souvent assez faible de la totalité des globulines précipitables par cet acide dans d'autres conditions d'expériences.

Les variations de l'abondance du précipité s'expliquent de la façon suivante :

La quantité de globuline précipitée dépend à la fois du taux de dilution du sérum (Lecomte du Nouy [29], Boutaric et Doladilhe [30]) et de la concentration en ions H du sérum dilué (Doladilhe [31]). Elle atteint un maximum lorsque le pH du sérum additionné d'acide chlorhydrique acquiert une valeur optima qui dépend du taux de dilution et correspond au point isoélectrique des globulines dans le milieu considéré.

L'abondance du précipité décroît rapidement dès que le pH s'écarte sensiblement de cette valeur, et la précipitation cesse de se produire lorsqu'il dépasse une certaine limite supérieure ou une certaine limite inférieure. D'où il résulte que :

1° Toute variation, même peu importante du titre et de la quantité d'acide mis en œuvre fait nécessairement varier l'abondance du précipité puisqu'elle modifie le taux de dilution et le pH du milieu de précipitation ;

2° L'abondance du précipité obtenu en additionnant uniformément tous les sérums d'une même quantité d'acide chlorhydrique d'un titre déterminé varie nécessairement suivant les sérums pour deux raisons :

La première est que le pH du milieu de précipitation adopte une valeur variant suivant les sérums dans les limites assez larges. En mesurant ce pH par la méthode électrométrique (procédé à la quinhydrone) pour 30 sérums additionnés de 9 volumes d'acide chlorhydrique N/100, nous avons trouvé des valeurs échelonnées entre 6,35 et 6,74. La valeur moyenne était de 6,49 pour l'ensemble des sérums étudiés.

La deuxième raison est que les globulines du sérum subissent sous certaines influences physiologiques ou pathologiques des altérations qui s'accompagnent de déplacements parfois importants de leur point isoélectrique (Vlès et Coulon [32], Rossier [33]).

2° La sensibilité de la réaction de Bordet-Wassermann pratiquée sur la fraction non précipitable du sérum ne varie pas lorsqu'on emploie 8 volumes d'acide N/300 au lieu des 9 volumes utilisés pour nos expériences ; elle diminue très légèrement lorsqu'on emploie 9 volumes d'acide N/250 ou 10 volumes d'acide N/300.

Aucun rapport précis n'est apparu entre l'abondance de la précipitation et la sensibilité de la réaction de Bordet-Wassermann. La seule remarque qu'il soit possible de faire est que

l'intensité de la réaction fournie par la fraction non précipitable de certains sérums syphilitiques diminue très légèrement lorsque la précipitation augmente d'abondance.

Nous avons conclu de cette étude qu'il n'y avait pas lieu de modifier la proportion de 9 volumes d'acide chlorhydrique N/300 pour 1 volume de sérum adopté dès le début de nos recherches.

La deuxième question que nous avons examinée a été de déterminer s'il est préférable de chauffer les sérums avant ou après l'élimination de la fraction précipitable.

Les expériences que nous avons faites à ce sujet ont montré que : 1° l'abondance de la précipitation varie légèrement suivant que le sérum est ou non préalablement chauffé ; 2° les résultats de la réaction de Bordet-Wassermann sont exactement les mêmes lorsqu'on opère sur la fraction non précipitable d'un sérum chauffé avant ou après l'élimination de la fraction précipitable.

D'où il résulte que l'opérateur peut choisir à son gré de chauffer le sérum avant de le précipiter ou de précipiter le sérum avant de chauffer la fraction non précipitable (diluée onze fois en milieu neutre et isotonique). Lorsqu'on doit opérer sur un grand nombre de sérums, il est préférable de chauffer le sérum entier afin de réduire l'encombrement des tubes qui doivent être placés au bain-marie.

Neutralisation de la fraction non précipitable.

Un autre problème était de déterminer à quel pH il convient d'amener la fraction non précipitable du sérum pour y pratiquer la réaction de Bordet-Wassermann avec le maximum d'avantages.

Nous avons étudié dans cette intention l'influence des variations du pH de la fraction non précipitable sur la spécificité et la sensibilité de la réaction. Les résultats que nous avons observés concordent généralement avec les données déjà publiées par Sierakowski et Zablocki [34], qui ont étudié l'influence des variations du pH sur la réaction de Bordet-Wassermann pratiquée dans le sérum entier. Voici ce que nous avons constaté :

1° La spécificité de la réaction de Bordet-Wassermann est

intégralement conservée lorsque le pH de la fraction non précipitable est compris entre 7 et 9 ; elle diminue très sensiblement dès qu'il s'abaisse au-dessous de 7 et devient complètement nulle lorsqu'il atteint 6,6 ou 6,5 ;

2° La sensibilité de la réaction n'est pas modifiée lorsque le pH de la fraction non précipitable varie entre 7 et 7,8 ; elle diminue lorsqu'il est compris entre 8 et 9.

D'où il résulte que les valeurs de pH comprises entre 7 et 7,8 correspondent au maximum de sensibilité qui puisse être obtenue sans diminuer la valeur spécifique de la réaction. Nous avons conclu de cette étude :

1° Qu'il n'y avait pas lieu de modifier la valeur de 7,2 adoptée dès le début de nos recherches pour le pH de la fraction non précipitable ;

2° Qu'il était indispensable de prendre des garanties contre les erreurs auxquelles on s'exposerait en pratiquant la réaction de Bordet-Wassermann sur une fraction non précipitable dont le pH serait sensiblement inférieur à 7 ou supérieur à 8.

Au cours de nos recherches sur le rôle des globulines dans la réaction de Bordet-Wassermann nous avons dû, pour éviter de telles erreurs, contrôler pour chaque sérum et corriger au besoin le pH de la fraction non précipitable préalablement additionnée d'une proportion uniforme de soude. Ce procédé nous a semblé peu pratique pour opérer sur un grand nombre de sérums et nous l'avons modifié de la façon suivante :

Au lieu de soude, nous ajoutons à la fraction non précipitable un tampon de phosphates convenablement choisi qui amène uniformément le pH à 7,2 pour tous les sérums. Il devient inutile, dans ces conditions, de contrôler dans chaque cas le pH de la fraction de sérum utilisée pour la séro-réaction. Les petites erreurs d'expériences dans la préparation ou la mesure des réactifs ne peuvent en aucun cas faire varier le pH de la fraction non précipitable suffisamment pour fausser les résultats de la réaction de Bordet-Wassermann.

Technique.

Voici les détails d'exécution du mode opératoire que nous avons finalement adopté.

1° PRÉPARATION DE LA FRACTION NON PRÉCIPITABLE DU SÉRUM.

— Tous les sérums non altérés peuvent être utilisés même s'ils sont lactescents ou teintés d'hémoglobine ; il est inutile de les centrifuger avant de les précipiter.

On commence par chauffer 1 volume (habituellement 2 c. c. 5 de sérum à 56° pendant trente minutes ; puis, on ajoute 9 volumes d'acide chlorhydrique N/300. On mélange et on abandonne pendant au moins une heure à la température du laboratoire. La durée de cette attente peut sans inconvénient être portée à vingt-quatre heures à condition de placer les sérums en glacière pendant la précipitation.

On centrifuge ensuite à 3.000 tours par minute pendant trois à quatre minutes ; l'adhérence du culot rend la décantation très facile et permet de recueillir la totalité du liquide surnageant.

Ce liquide est ensuite mesuré et additionné d'un dixième de son volume de la solution suivante : (1).

Solution de phosphate monopotassique $\frac{2M}{15}$, soit 18 gr. 156	
par litre, en centimètres cubes.	65
Solution de phosphate disodique $2H^2O \frac{2M}{15}$, soit 23 gr. 752	
par litre, en centimètres cubes.	435
Chlorure de sodium, en grammes.	85
Eau distillée quantité suffisante pour (centimètres cubes) .	1.000

Lorsqu'on opère simultanément sur plusieurs sérums précipités et centrifugés dans des conditions identiques, il n'est pas nécessaire de mesurer pour chaque sérum la quantité de liquide recueillie après décantation totale ; cette quantité varie si peu d'un cas à l'autre qu'il n'y a aucun inconvénient à la considérer comme invariable. La petite erreur ainsi commise ne peut avoir aucune influence sur les résultats de la séro-réaction.

(1) Les phosphates nécessaires pour préparer cette solution sont vendus dans le commerce sous la désignation de « phosphates pour la détermination du pH ». Ils doivent être conservés à l'abri de l'humidité dans des flacons soigneusement bouchés.

Il est prudent de vérifier la perte de poids subie après calcination qui doit être de 13,23 p. 100 pour le phosphate monopotassique et de 25,28 p. 100 pour le phosphate disodique $2H^2O$.

Les produits qui renferment un excès d'eau peuvent être utilisés à condition d'en tenir compte dans la préparation des solutions.

La liqueur obtenue après addition de la solution chlorurée phosphatée est prête à servir à la recherche de la réaction de Bordet-Wassermann; elle renferme la fraction non précipitable du sérum diluée onze fois en milieu isotonique de $\text{pH} = 7,2$.

2° RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN. — Nous suivons pour la réaction de fixation la technique décrite par Calmette et Massol.

Titrage préalable de l'alexine. — L'eau salée utilisée pour ce titrage est amenée au $\text{pH} 7,2$ par addition d'un vingtième de volume du tampon suivant :

Solution de phosphate monopotassique $\frac{2\text{M}}{45}$, en centimètres	
cubes	135
Solution de phosphate disodique $2\text{H}^2\text{O} \frac{2\text{M}}{45}$, en centimètres	
cubes	365

Des quantités d'alexine croissant de 0,001 à 0,015 sont diluées dans cette eau salée sous un volume uniforme de 3 cent. cubes et placées pendant une heure dans un bain-marie à 37° . Chaque tube reçoit ensuite 0 c. c. 2 de globules de mouton à 25 p. 100 sensibilisés par 20 unités de sérum hémolytique de cheval (1); le portoir est remplacé pendant trente minutes dans le bain-marie.

La lecture du résultat est faite après deux heures d'attente à la température du laboratoire. La plus petite dose qui suffit à assurer l'hémolyse totale est prise pour unité d'alexine; elle est généralement comprise entre 0,003 et 0,012.

Réaction de fixation. — La fraction non précipitable est employée uniformément à la dose de 3 cent. cubes correspondant à 0 c. c. 27 de sérum entier.

L'antigène de Bordet-Ruelens est employé après l'évaporation au bain-marie à 37° . Le résidu est broyé dans une capsule avec 8/10 de volume d'eau distillée et additionné de 7,2 volumes d'eau salée physiologique. L'émulsion ainsi

(1) Nous prenons pour unité de sérum hémolytique la petite dose (généralement 0,003 à 0,004) capable d'assurer l'hémolyse totale de 0,2 de globules à 25 p. 100 en présence de 0 c. c. 1 d'alexine pure.

obtenue est employée uniformément à la dose de 0 c. c. 2, correspondant à 1/40 de centimètre cube d'antigène pur.

L'alexine titrée est employée à doses progressivement croissantes (généralement 1, 2, 3 et 4 unités).

Les tubes utilisés pour la séro-réaction ont un diamètre intérieur d'environ 12 millimètres. Ils reçoivent successivement la fraction non précipitable, l'antigène et l'alexine, et sont placés pendant une heure dans un bain-marie à 37°. On ajoute à ce moment la dose de globules sensibilisés que nous avons déjà indiquée pour le titrage de l'alexine et les portoirs sont replacés dans le bain-marie pendant trente minutes.

La lecture des résultats est faite une première fois peu après la sortie du bain-marie; elle est recommencée une deuxième fois le lendemain matin après une nuit d'abandon à la température du laboratoire.

La réaction est considérée comme positive lorsque chacune des deux lectures permet de constater la fixation d'au moins une unité d'alexine.

III. — Comparaison de la nouvelle technique avec les réactions de Bordet-Wassermann, de Kahn, de Vernes et de Hecht pratiquées sur le sérum entier.

Nous avons cherché à nous rendre compte des avantages et des inconvénients que cette nouvelle technique pouvait présenter dans la pratique du sérodiagnostic de la syphilis, et nous avons entrepris de l'expérimenter sur un grand nombre de sérums en comparant sa sensibilité et sa spécificité à celles des réactions de Bordet-Wassermann, de Kahn, de Vernes et de Hecht pratiquées sur le sérum entier. 48 sérums nouveaux et 1891 sérums pathologiques ont été étudiés.

Les sérums normaux ont été prélevés chez des étudiants en médecine ou des infirmières qui ne présentaient aucun symptôme ou antécédent suspect de syphilis.

Les sérums pathologiques proviennent pour la plupart du service de Clinique Médicale du Professeur G. Carrière et du service de Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques du Professeur E. Bertin. Nous avons choisi de préférence des

sujets hospitalisés ou régulièrement suivis à la consultation externe et nous avons éliminé de nos recherches tous ceux dont les antécédents étaient mal connus.

Les malades étudiés ont été classés en trois catégories :

1° Syphilitiques avérés présentant des antécédents ou des symptômes caractéristiques de syphilis ;

2° Suspects de syphilis présentant des antécédents ou des symptômes qui permettaient de considérer le diagnostic de syphilis comme très probable ;

3° Malades non syphilitiques atteints des affections les plus diverses (tuberculoses, cancers, cardiopathies, maladies infectieuses, dermatoses, etc.).

Nous avons pratiqué pour chaque sujet :

1° La réaction de Bordet-Wassermann sur le sérum débarrassé de la fraction précipitable par l'acide chlorhydrique suivant la technique que nous venons d'exposer ;

2° La réaction de Bordet-Wassermann sur le sérum entier suivant la technique précédemment indiquée ;

3° La réaction de Kahn sur le sérum entier suivant la technique de l'auteur.

4° La réaction de Vernes sur le sérum entier suivant la technique de l'auteur. Les résultats ont été lus au photomètre et considérés comme positifs lorsqu'ils ont été trouvés supérieurs à 4.

5° La réaction de Hecht sur le sérum entier suivant la technique de Mutermilch.

Les tableaux VI (pour les réactions de Bordet-Wassermann, Kahn et Vernes) et VII (pour la réaction de Hecht), indiquent les pourcentages de résultats positifs obtenus pour les sujets normaux, les syphilitiques, les suspects de syphilis et les malades non syphilitiques. Le tableau VIII permet de distinguer les pourcentages de résultats positifs obtenus sur le sérum entier des syphilitiques avérés, suivant que la réaction pratiquée sur le sérum débarrassé de la fraction précipitable, s'est montrée positive ou négative.

Les cinq réactions étudiées sont demeurées négatives chez les sujets normaux.

La réaction de Bordet-Wassermann, pratiquée sur le sérum débarrassé de la fraction précipitable, a fourni 70,3 p. 100 de

TABLEAU VI. — Comparaison avec les réactions de Bordet-Wassermann (sérum entier) Kahn et Vernes.

	NOMBRE de sérums étudiés	POURCENTAGE de résultats positifs			
		Nouvelle technique	Bordet- Wassermann Sérum entier	Kahn	Vernes
Sujets normaux	48	0	0	0	0
Malades non syphilitiques.	1.170	0	0	0,76	0
Suspects de syphilis.	118	31,3	40,1	23,7	48,6
Syphilitiques avérés.	603	70,3	39,3	34,9	44,6
Total	1.939				

TABLEAU VII. — Comparaison avec la réaction de Hecht.

	SÉRUMS étudiés (Hecht possible)	POURCENTAGE de résultats positifs	
		Nouvelle technique	Hecht
Sujets normaux	39	0	0
Malades non syphilitiques.	667	0	2,1
Suspects de syphilis.	97	28,8	49,5
Syphilitiques avérés.	362	71,2	38,1
Total	1.165		

TABLEAU VIII. — Pourcentages de résultats positifs obtenus sur le sérum entier des syphilitiques.

	BORDET- WASSERMANN	KAHN	VERNES	HECHT
Syphilitiques présentant une réaction <i>positive</i> par la nou- velle technique	57	78,3	59,6	53,4
Syphilitiques présentant une réaction <i>négative</i> par la nou- velle technique	0	1,1	0,5	0,9

résultats positifs pour l'ensemble des syphilitiques et 31,3 p. 100 pour les suspects de syphilis. Elle est demeurée négative chez tous les malades non syphilitiques.

La réaction de Bordet-Wassermann, pratiquée sur le sérum entier, a fourni 39,3 p. 100 de résultats positifs pour l'ensemble des syphilitiques et 10,1 p. 100 pour les suspects de syphilis. Elle est demeurée négative chez tous les malades non syphili-

tiques et chez tous les syphilitiques présentant une réaction de Bordet-Wassermann négative dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable. Elle n'a fourni que 57,0 p. 100 de résultats positifs chez les syphilitiques présentant une réaction positive dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable.

La réaction de Kahn a fourni 54,9 p. 100 de résultats positifs pour l'ensemble des syphilitiques, 23,7 p. 100 pour les suspects de syphilis, 0,76 p. 100 pour les malades non syphilitiques, 78,3 p. 100 pour les syphilitiques présentant une réaction positive et 1,1 p. 100 pour les syphilitiques présentant une réaction négative dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable.

La réaction de Vernes a fourni 41,6 p. 100 de résultats positifs (supérieurs à 4) pour l'ensemble des syphilitiques et 18,6 p. 100 pour les suspects de syphilis; elle est demeurée négative chez tous les malades non syphilitiques et n'a fourni que 59,6 p. 100 de résultats positifs chez les syphilitiques présentant une réaction positive et 0,5 p. 100 chez les syphilitiques présentant une réaction négative dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable.

La réaction de Hecht a fourni dans 1.165 cas où elle était possible 38,1 p. 100 de résultats positifs pour l'ensemble des syphilitiques, 19,5 p. 100 pour les suspects de syphilis, 2,1 p. 100 pour les malades non syphilitiques, 53,4 p. 100 pour les syphilitiques présentant une réaction positive et 0,9 p. 100 pour les syphilitiques présentant une réaction négative dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable.

La comparaison de la nouvelle technique et de la réaction de Bordet-Wassermann pratiquée sur le sérum entier, confirme les conclusions précédemment exposées de nos recherches sur le rôle de la fraction de sérum précipitable par l'acide chlorhydrique.

La nouvelle technique a fourni des résultats négatifs chez tous les sujets non syphilitiques, elle a fourni 70,3 p. 100 de résultats positifs chez les syphilitiques. Elle a donc fait preuve d'une spécificité égale et d'une sensibilité très supérieure à celle de la réaction pratiquée sur le sérum entier qui n'a fourni que 39,3 p. 100 de résultats positifs pour l'ensemble des syphilitiques.

La comparaison avec les autres réactions pratiquées sur le sérum entier montre que la nouvelle technique possède :

1° Une spécificité égale à celle de la réaction de Vernes qui est demeurée négative chez tous les malades non syphilitiques et supérieure à celle des réactions de Kahn et de Hecht qui ont fourni respectivement chez les mêmes malades 0,76 et 2,4 p. 100 de résultats positifs non spécifiques ;

2° Une sensibilité supérieure à celles des réactions de Kahn, de Vernes et de Hecht, qui n'ont fourni respectivement que 54,9, 41,6 et 38,1 p. 100 de résultats positifs pour l'ensemble des syphilitiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUGUSTE. *Bull. Académie de médecine*, 30 octobre 1934.
- [2] DOLADILHE. *Ces Annales*, **53**, 1934, 379.
- [3] STERN. *Biochem. Zeitschr.*, **144**, 1924, 115.
- [4] KOPACZEWSKI. *C. R.*, **171**, 1920, 1171.
- [5] FORSMANN. *Biochem. Zeitschr.*, **177**, 1926, 243.
- [6] RUPPEL, ORNSTEIN, CARL et ZASCH. *Zeitsch. f. Hygiene u. Infektionskr.*, **97**, 1923, 188.
- [7] FRIEDEMANN. *Zeitsch. f. Hygiene u. Infektionskr.*, **67**, 1910, 279.
- [8] SCHMIDT. *Zeitsch. f. Hygiene u. Infektionskr.*, **69**, 1911, 513.
- [9] KAPSENBERG. *Ces Annales*, **35**, 1912, 648.
- [10] WEISBACH, Monographie (2^e édition), Gustav Fischer, Iéna, 1924.
- [11] FREUND et ZUSTIG. *Biochem. Zeitsch.*, **249**, 1932, 373.
- [12] SALTA et DONATI. *Zeitsch. f. Immunit. u. exp. Ther.*, **7**, 1910, 702.
- [13] DUHOT. *C. R. Soc. Biol.*, **76**, 1914, 36.
- [14] RENAUX. *C. R. Soc. Biol.*, **83**, 1920, 1299.
- [15] MANDELBAUM. *Münch. med. Woch.*, n° 33, 1920.
- [16] SAHLMANN. *Zeitsch. f. Immunit. u. exp. Ther.*, **33**, 1922, 130.
- [17] MACKIE. *Journ. of Hyg.*, **21**, 1923, 386.
- [18] GLOOR et KLINGER. *Zeitsch. f. Immunit. u. exp. Ther.*, **29**, 1920, 435.
- [19] SACHS, *Berlin. klin. Wochens.*, n° 58, 1921.
- [20] FELKE. *Zeitsch. f. Immunit. u. exp. Ther.*, **32**, 1921, 137.
- [21] NOGUCHI. *Zeitsch. f. Immunit. u. exp. Ther.*, **9**, 1911, 715.
- [22] BIRCHER et FARLAND. *Arch. of dermat. a. syphil.*, **5**, 1922, 215.
- [23] HOLKER. *Journ. of Path. and Bact.*, **25**, 1922, 281.
- [24] GATE, GARDÈRE et BAGINAUD. *C. R. Soc. Biol.*, **105**, 1930, 393.
- [25] WOLF et RIDEAL. *Journ. of Hyg.*, **25**, 1926, 366.
- [26] RUBINSTEIN et RADOSSAVLIEVITCH. *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 1918, 1145.
- [27] BORY. *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 1918, 128 et 247.
- [28] MEANS. *Journ. of Immunology*, **8**, 1923, 433.
- [29] LECOMTE DU NOUY. *C. R. Biol.*, **106**, 1931, 85.
- [30] BOUTARIC et DOLADILHE. *C. R.*, **194**, 1932, 1385.
- [31] DOLADILHE. *C. R.*, **196**, 1934, 1884.
- [32] VLÈS et COULON. *Archives de Physique biologique*, **5**, n° 3, 1923.
- [33] ROSSIER. *Annales de Médecine*, **23**, 1928, 348.
- [34] SIERAKOWSKI et ZARLOCKI. *Zentralbl. f. Bakl. I.*, **121**, 1931, 362.

SUR LA VITALITÉ DU BCG DANS L'ORGANISME VACCINÉ

par J. ZEYLAND et M^{me} E. PIASECKA-ZEYLAND.

(Centre antituberculeux de la clinique infantile. Directeur : Professeur K. JONSCHER, et Institut de Microbiologie médicale. Directeur : Professeur L. PADLEWSKI, Université de Poznan, Pologne.)

Dans plusieurs publications antérieures (1) nous avons rapporté les résultats positifs de nos cultures de bacilles BCG à partir des ganglions mésentériques ou des amygdales d'enfants vaccinés par voie buccale et décédés de maladies diverses. Ainsi, nous avons réussi, les premiers, à fournir une preuve indiscutable de la pénétration du vaccin BCG à travers la paroi du tube digestif dans l'intérieur de l'organisme de l'enfant.

En dehors de ces cas autopsiés, la culture de bacilles BCG a réussi une fois, après l'ensemencement du contenu d'un abcès froid sous-maxillaire d'un enfant vacciné par voie buccale qui a présenté des symptômes d'une diathèse lymphatique et qui s'est plus tard très bien développé (2).

L'un de nous également a obtenu expérimentalement les mêmes résultats positifs chez des cobayes vaccinés *per os* (3).

Cependant peu d'auteurs ont confirmé nos résultats : Park, Kereszturi et Mishulow (4) ont cultivé une seule fois le BCG en partant d'un ganglion mésentérique d'un enfant mort six semaines après la vaccination faite par voie buccale. Kostic-Yoksic (5) [dans 4 cas] et Nègre et Valtis (6) [dans 4 cas] ont trouvé des bacilles avirulents dans des adénites sous-maxillaires d'enfants vaccinés *per os*. En employant une autre

(1) Ces *Annales*, 42, 1928, suppl. p. 61; 43, 1929, p. 767; 47, 1931, p. 601; 54, 1935, p. 86.

(2) *Rev. de la Tub.*, 11, 1930, p. 383.

(3) Ces *Annales*, 45, 1930, p. 439; *C. R. Soc. Biol.*, 103, 1930, p. 819.

(4) *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 101, 1933, p. 1619.

(5) *Rev. Phtis. méd. soc.*, 13, 1932, p. 281.

(6) *Bull. Acad. Méd.*, 99, 1935, p. 585.

méthode (celle de Löwenstein) Calmette, Weil-Hallé, Saenz et Costil (1) ont constaté chez 3 nourrissons et 2 chimpanzés la présence des bacilles BCG cultivables dans le sang prélevé quelques heures après l'ingestion du vaccin. Chez les cobayes, Nélis (2) a cultivé lui aussi les bacilles BCG en ensemençant des ganglions lymphatiques.

Cependant la plupart des auteurs se sont contentés de donner d'autres preuves du passage de bacilles BCG à travers la muqueuse intestinale des vaccinés *per os* en démontrant leur présence par la méthode bactérioscopique moins exacte

Saenz (3), Ninni (4) ou par une méthode indirecte, celle des réactions tuberculiniques chez des vaccinés [Debré et Cofino (5)], Debré, Lelong et M^{re} Pictet (6).

Récemment Debré et Perrault (7) ont publié les résultats négatifs des essais de culture des bacilles BCG faits après l'ensemencement des tissus prélevés *post mortem* sur des nourrissons vaccinés.

Cette rapide revue des publications concernant les preuves du passage du BCG ingéré dans l'organisme établit que le fait de l'absorption du BCG ne peut pas être mis en doute; mais elle montre aussi que la preuve la plus certaine de ce fait, c'est celle de la culture du BCG; or, celle-ci présente évidemment certaines difficultés pour les investigateurs, c'est pourquoi le nombre des cultures obtenues en partant d'organes vaccinés est resté si restreint. Pour expliquer cette difficulté, nous voulons attirer l'attention sur les observations suivantes :

Jusqu'au 1^{er} juillet 1935, nous avons fait 133 autopsies d'enfants vaccinés *per os* par le BCG. De ce nombre, 101 autopsies ont pu être suivies d'un examen bactériologique, c'est-à-dire du prélèvement aseptique de ganglions mésentériques ou, exceptionnellement, d'amygdales et de l'ensemencement sur milieux à l'œuf après broyage. En voici les résultats :

(1) *Bull. Acad. Méd.*, 110, 1933, p. 203.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 104, 1930, p. 1187.

(3) *Ces Annales*, 44, 1930, p. 437; *Zeitschr. Tbk.*, 56, 1930, p. 131.

(4) *C. R. Soc. Biol.*, 109, 1932, p. 705.

(5) *C. R. Soc. Biol.*, 102, 1929, p. 513 et 516; *Ces Annales*, 44, 1930, p. 12.

(6) *C. R. Soc. Biol.*, 116, 1934, p. 35 et 37.

(7) *C. R. Soc. Biol.*, 118, 1935, p. 31.

	DÉCÉDÉS AU COURS DU ... ^e MOIS						TOTAL
	1	2	3	4	5	6-23	
Cas examinés bactériologiquement.	15	15	19	17	12	23	101
Résultats positifs des cultures.	0	6	4	4	2	0	16

Il en résulte que le temps favorable à la culture du BCG provenant des ganglions lymphatiques d'enfants vaccinés après la naissance est limité à la période du deuxième au cinquième mois.

Le tableau suivant est encore plus démonstratif. Nous y avons groupé chronologiquement tous les examens bactériologiques :

ANNÉE	CAS EXAMINÉS bactériologiquement	RÉSULTATS positifs des cultures
1928	23	7
1929	14	7
1930	15	1
1931	8	1
1932	9	0
1933	9	0
1934	18	0
1935 (première moitié).	5	0
Total.	101	16

Nous y voyons d'une part que dans les deux premières années nous avons cultivé le BCG chez le tiers à la moitié des cas examinés, d'autre part, qu'il n'y a que deux résultats positifs dans les deux années suivantes et que depuis quatre ans nous n'avons pas réussi, même une seule fois, à cultiver le BCG. Cependant rien, depuis le début de nos recherches, n'a changé, car nous employons toujours la même technique. La seule chose qui ait été modifiée — en 1930 précisément — c'est le mode de culture du BCG destiné à la préparation du vaccin : au lieu de le cultiver sur la pomme de terre glycinée ordinaire, nous n'utilisons, depuis 1930, sur le conseil de M. Guérin, que des pommes de terre biliées.

Ce changement assez rapide dans la possibilité de recultiver les bacilles BCG à partir des ganglions d'enfants autopsiés nous a conduits à penser que la vitalité du BCG dans l'orga-

nisme vacciné, c'est-à-dire sa propriété de vivre et de se multiplier dans les tissus a diminué. C'est pourquoi il nous a paru important de répéter les expériences publiées antérieurement (1) et faites en 1929 sur les cobayes, dans des conditions rigoureusement identiques.

Nous rappellerons que 16 cobayes nouveau-nés ont reçu trois jours de suite *per os* au moyen d'une pipette, 10 milligrammes de BCG dans 0 c. c. 2 de liquide, la dose totale de BCG étant ainsi de 30 milligrammes. Les cobayes ont été sacrifiés au bout de deux, trois, quatre semaines, trois et six mois. Le suc des ganglions cervicaux et mésentériques a été ensemencé sur des tubes de milieux à l'œuf après avoir subi l'action de l'acide sulfurique à 6 p. 100.

Récemment, en 1934, nous avons répété cette expérience en faisant ingérer à 12 cobayes nouveau-nés la même dose de BCG (30 milligrammes) comme nous l'avions fait antérieurement. Pour faciliter une comparaison, les résultats sont exposés dans le tableau suivant :

1929			1934		
EXAMEN bactériologique au bout de ... semaines	NOMBRE de cobayes vaccinés	CULTURE positive dans les cas	EXAMEN bactériologique au bout de ... semaines	NOMBRE de cobayes vaccinés	CULTURE positive dans les cas
2	1	1	1 1/2	1	0
3	1	1	3	1	0
4	2	2	4	1	0
12	4	3	5	1	0
20-24	8	0	6	1	0
			7	1	0
			8	1	0
			9	5	1
2-24	16	7	1 1/2-9	12	1

D'après le tableau ci-dessus nous voyons que les résultats obtenus en 1934 sont mauvais si nous les comparons à ceux obtenus en 1929. En conséquence, nous avons varié les conditions expérimentales en augmentant la dose de BCG. Nous avons fait ingérer à un nouveau lot de 11 cobayes nouveau-nés une dose double, soit 60 milligrammes de BCG. Voici le résultat de cette expérience :

(1) *Ces Annales*, 44, 1930, p. 437.

EXAMEN bactériologique au bout de ... semaines	NOMBRE de cobayes vaccinés à la dose de 60 milligrammes	CULTURE positive dans les cas
1	1	0
2	1	0
3	3	2
4	4	1
5	2	0
1-5.	11	3

Il en ressort qu'en effet l'augmentation de la dose ingérée a un peu amélioré les résultats des cultures, en d'autres termes : que la possibilité de cultiver les bacilles BCG qui se trouvent dans les ganglions lymphatiques d'animaux vaccinés *per os* dépend surtout du nombre de ces bacilles dans les organes examinés.

De cette façon, l'hypothèse que nous avons émise en nous appuyant sur des examens bactériologiques d'enfants autopsiés, nous semble justifiée par le résultat de nos expériences : la vitalité du BCG dans l'organisme vacciné peut diminuer, ou du moins, la souche de BCG cultivée par nous (depuis le 21 juillet 1932 nous avons la souche 441-S1 de l'Institut Pasteur) a perdu sa vitalité ancienne au cours des années. Nous tenons à souligner ici qu'il ne s'agit que de la vitalité dans les tissus de l'organisme humain et animal vacciné et qu'en attirant l'attention sur ce problème nous n'avons aucune raison de mettre en doute les autres qualités du BCG. Nous-mêmes, nous nous assurons constamment par l'observation du développement d'enfants vaccinés et par les résultats de nos récentes expériences sur le pouvoir immunisant dans la tuberculose de cobayes (1), de la valeur vaccinale du BCG. Mais une fois la question posée, il faut l'étudier dans d'autres laboratoires, il faut trouver la cause de cette diminution de vitalité du BCG et prévenir son affaiblissement ultérieur, peut-être en la cultivant sur d'autres milieux. Il faut aussi prendre en considération la dose vaccinale et le mode de vaccination pour conserver dans l'avenir les bonnes propriétés immunisantes que l'on observe maintenant. Dans notre centre de vaccinations antituberculeuses nous employons la méthode des injections sous-cuta-

(1) *Beitr. Klin. Tbk.*, 85, 1934, p. 369.

nées qui causent parfois (même après la petite dose de 0 milligr. 01 de BCG) des abcès froids, contenant des bacilles BCG très facilement recultivables même trois mois après la vaccination.

CONCLUSIONS.

L'examen bactériologique systématique des enfants vaccinés au BCG et autopsiés démontre qu'il n'est plus possible de recultiver les bacilles-vaccins, bien qu'on ait employé la même technique que celle utilisée de 1928 à 1929.

De même, une répétition des expériences faites sur des cobayes nouveau-nés auxquels on avait fait ingérer de fortes doses de BCG n'a plus donné les mêmes résultats qu'en 1929.

Il s'agit donc très probablement d'une diminution de la vitalité du BCG dans l'organisme vacciné.

Il convient de prendre les mesures nécessaires pour prévenir une diminution ultérieure de cette vitalité, diminution qui pourrait influencer le pouvoir vaccinant, très efficace jusqu'à présent du BCG.

TITRAGE DES SÉRUMS ANTIPNEUMOCOCCIQUES DES TYPES I ET II PAR LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

par L.-K. VIKTOROFF, L.-A. GUINTZE-VERNER et M.-W. DEMIDOVA.

(*Institut Tarashevitch de Contrôle des Sérums et Vaccins.
Laboratoire des travaux expérimentaux. Directeur : Profes-
seur L.-M. HATENEVER; Chef du Laboratoire : Dr L.-K. VIK-
TOROFF.*)

Le pouvoir curatif des sérums antipneumococciques était jusqu'à présent évalué par leur effet préventif dans l'infection de la souris. Plusieurs méthodes ont été préconisées pour ce titrage *in vivo* : les méthodes anciennes, proposées par Avery, Chickering, Cole, Dochez, à l'Institut Rockefeller à New-York, celles de Neufeld et Handel, à l'Institut Robert Koch à Berlin; les modifications de Felton, Parish, Trevan et autres. Or, la grande sensibilité des souris aux pneumocoques, la nécessité où l'on se trouve d'avoir toujours une souche de virulence constante et un sérum-étalon pour comparer les résultats (d'ailleurs souvent contradictoires) rendent ces méthodes trop compliquées.

Beard et Clapp affirment qu'un seul essai de titrage sur la souris ne suffit pas pour évaluer la quantité d'unités d'un sérum antipneumococcique, même dans les cas où compte est tenu des facteurs capables d'influencer les résultats de l'expérience, et où une série parallèle d'essais avec un sérum étalon plusieurs fois vérifié sert de contrôle. Ces auteurs pensent qu'un titrage précis du pouvoir préventif nécessite au moins deux séries d'expériences parallèles avec 10 souris pour chaque dilution de sérum. De l'avis de Parish et Trevan, ce n'est qu'en prenant 20 ou 40 souris pour chaque dose qu'on arrive à des résultats nets dans la détermination du titre des sérums antipneumococciques. Smith s'est servi de 50 souris pour chaque

dilution de sérum qu'il titrait. Il est donc naturel que, depuis longtemps, plusieurs auteurs se soient efforcés de substituer à l'évaluation peu précise et très coûteuse du pouvoir préventif *in vivo* une méthode de titrage *in vitro*. C'est ainsi qu'on a voulu mesurer l'effet curatif par l'appréciation de la quantité d'autres anticorps : agglutinines et précipitines. Les résultats obtenus n'étant pas assez sûrs, ces méthodes ne sont pas entrées dans la pratique. Depuis que Avery et Heidelberger ont extrait des cultures pneumococciques des polysaccharides spécifiques, plusieurs auteurs se sont attachés à l'étude de la réaction de précipitation du sérum antipneumococcique avec le polysaccharide spécifique en vue d'en faire usage dans le titrage des sérums. Ce sont Friedländer, Sabotka et Banzhaf qui, les premiers, ont démontré que le pouvoir préventif d'un sérum antipneumococcique varie en raison direct de son titre précipitant (ce dernier étant obtenu par précipitation avec le polysaccharide spécifique). Zozaya, Boyer et Clark, Smith, Brown, tirent leurs sérums en déterminant la dernière dilution donnant une précipitation optima avec le polysaccharide spécifique. Heidelberger, Sia et Kendall, et Felton, recommandent, pour apprécier la qualité du sérum, de doser la protéine spécifique précipitée. Ainsi tous ces savants ont constaté l'existence de rapports entre le pouvoir préventif du sérum et son titre précipitant.

Nous avons cherché, dans ce travail, à établir les relations qui existent entre les différents anticorps contenus dans un sérum antipneumococcique et à comparer leurs valeurs dans l'appréciation du titre de ce sérum *in vitro*.

Des sérums antipneumococciques du type I et II ont donc été examinés au point de vue de leur richesse en anticorps : précipitines, agglutinines, bactériotropines et pouvoir préventif ; le titre préventif déterminé sur souris nous servait de critérium pour apprécier le pouvoir curatif du sérum.

MATÉRIAUX D'EXPÉRIENCES.

Nous avons en à notre disposition 21 sérums antipneumococciques, provenant de différents Instituts de l'URSS et de plusieurs Instituts étrangers, tels que le Bureau of Laborato-

ries de New-York, l'Institut Lister de Londres, l'Institut Pasteur de Paris et l'Institut Sérothérapique de Vienne.

12 sur les 21 sérums mis à notre disposition étaient de type I, 7 du type II, 2 étaient bivalents (type I et II);

2 sérums du type I, 3 du type II avaient été envoyés comme sérums agglutinants; pour le reste, il s'agissait de sérums thérapeutiques.

DÉTERMINATION DU TITRE PRÉVENTIF CHEZ LES SOURIS.

Le pouvoir préventif des sérums était défini d'après la méthode du Felton. L'unité préventive était représentée par la plus petite quantité de sérum en centimètres cubes, protégeant pendant au moins quatre-vingt seize-heures 2 souris sur 3 contre 1 million de doses mortelles d'une culture de pneumocoque de virulence constante; 0 c. c. 5 en injection intrapéritonéale de cette culture, diluée à 10^{-8} (contenant de 3 à 5 pneumocoques) tuait en trente-six à quarante-huit heures les 2 souris. Cette dose représente la DLM. Nous avons opéré comme suit :

Des souris blanches pesant 16 à 20 grammes reçoivent en injection intrapéritonéale 0 c. c. 5 d'une culture de pneumocoques de dix-huit heures diluée à raison de 1/200, de sorte que 0 c. c. 5 de cette culture contiennent 500.000 DLM. On y ajoute 0 c. c. 5 de chaque dilution de sérum homologue à la culture.

Les dilutions de culture sont faites avec une solution stérile de 1 p. 100 de peptone (NaCl, 5 grammes; peptone, 10 grammes, pour 1 litre d'eau) de pH = 7,6. Le sérum est dilué avec de l'eau physiologique stérile.

Dilutions et injections ont été effectuées suivant les règles adoptées pour le titrage des sérums en général (pipettes de précision pour chaque dilution, plusieurs seringues, etc).

Pour apprécier les sérums de titre inconnu nous avons toujours procédé à une évaluation approximative avec des dilutions : à 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/600, etc, en utilisant une seule souris par dilution; dans la suite, pour préciser le titre, 3 souris ont été employées pour chaque dilution.

La culture une fois diluée, on introduit la dose d'essai dans autant de flacons qu'on a préparé de dilutions de sérum. On

aspire dans une seringue 0 c. c. 5 de culture et autant de sérum dilué, on agite prudemment et on injecte le tout dans la cavité péritonéale de la souris. On répète ces opérations avec chaque dilution de sérum.

Comme contrôle, on se sert d'un sérum dont le titre en unités préventives est connu.

Deux dilutions du sérum-étalon sont préparées : une, correspondant au titre donné, et une autre, deux fois plus petite ; culture et dilution sont inoculées à 3 souris ; en cas de survie du lot qui a reçu la plus petite dose de sérum, on pensera à une diminution de virulence de la souche.

Cette méthode dont nous nous sommes servis pour titrer 14 sérums du type I et 9 du type II nous a fourni l'occasion de voir à quelles difficultés se heurte l'expérimentateur dans l'évaluation du titre préventif des sérums antipneumococciques par la méthode biologique. Pour arriver à un titre plus ou moins précis, il fallait recommencer plusieurs fois l'essai de titrage dans des conditions strictement égales, en se servant d'une souche de virulence définitive et d'un sérum-étalon. Dans nos expériences, nous avons toujours opéré avec des souches très virulentes de pneumocoques types I et II qui avaient été mises à notre disposition par le Professeur W. Park du Bureau of Laboratories de New-York.

La virulence de nos souches était plusieurs fois vérifiée et maintenue au même niveau par passages successifs (souris) ; la dose mortelle minima restait toujours égale à 0 c. c. 5 d'une culture de dix-huit heures diluée 10^{-8} fois. Le sérum thérapeutique, série 193, type I, et le sérum agglutinant, série 9, type II, aimablement envoyés par M. le Dr A. Wadsworth de New-York nous servait d'étalon (1).

De nombreux titrages soignés ont permis de fixer pour le sérum type I le titre préventif à 300 unités et pour le sérum type II à 100 unités.

En déterminant la valeur préventive de ces 14 sérums (12 monovalents et 2 bivalents), nous avons constaté que la quantité d'unités était différente pour chaque sérum et variait

(1) Nous exprimons ici à MM. le Professeur W. Park et le Dr A. Wadsworth nos plus vifs remerciements pour la grande amabilité avec laquelle ils ont mis à notre disposition les sérums et les cultures.

de 3.600 UP (sérum thérapeutique concentré, série 21), jusqu'à 20 UP (série 31). Donc, nous avons eu à notre disposition plusieurs sérums, dont la valeur en unités prophylactiques présentait une large amplitude.

Les sérums du type II (7 monovalents et 2 bivalents) à l'exception de 3 sérums agglutinants américains à titre préventif relativement bas, ne contenaient pas d'anticorps en quantité décelables.

DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ DE PRÉCIPITINES SPÉCIFIQUES DANS LES SÉRUMS.

La quantité des précipitines spécifiques a été évaluée suivant deux méthodes : 1° en précipitant différentes dilutions de sérum par le polysaccharide spécifique; 2° en déterminant la quantité d'azote dans le précipité spécifique.

Les polysaccharides spécifiques des pneumocoques de type I et II ont été extraits d'après la méthode classique, élaborée par Avery et Heidelberger, et modifiée un peu par Heidelberger, Sia et Kendall.

Les pneumocoques étaient ceux dont nous nous servions pour l'évaluation du pouvoir prophylactique des sérums.

MÉTHODE EMPLOYÉE POUR EXTRAIRE LE POLYSACCHARIDE DU PNEUMOCOQUE DE TYPE I (suivant Heidelberger, Sia et Kendall).

20 litres d'une culture en bouillon phosphaté, âgée de cinq jours, contenant 0,3 p. 100 de glucose, tuée dans l'appareil de Koch, sont évaporées au bain-marie jusqu'au volume de 1 litre. Cette solution concentrée additionnée de 1 lit. 4 d'alcool à 96° est laissée telle quelle jusqu'au lendemain. Le liquide se sépare en 2 couches : la supérieure, noire et transparente, l'inférieure, jaune et opaque. On jette la première; la seconde est centrifugée à grande vitesse pendant une demi-heure. Après centrifugation, 3 couches se forment : la supérieure est brune et trouble, celle du milieu visqueuse, l'inférieure transparente. On se débarrasse des couches supérieure et inférieure; seule, la couche moyenne est dissoute dans 200 à 250 c. c. d'eau chaude. On centrifuge de nouveau, le culot est lavé deux fois dans une petite quantité d'eau. La solution transparente et les eaux de lavage réunies, refroidies et additionnées d'acide chlorhydrique concentré jusqu'à l'apparition de coloration au rouge Congo sont laissées jusqu'au lendemain à la glacière. Nouvelle centrifugation. Le précipité est lavé dans une petite quantité de 0,01 N d'acide chlorhydrique. La solution transparente avec l'eau de lavage (dont la quantité

ne doit pas dépasser 500 cent. cubes) est précipitée par 1 lit. 5 d'alcool refroidi, après forte agitation elle est remise à la glacière. Le lendemain, le précipité, séparé par centrifugation, est dissous dans l'eau additionnée de NaOH jusqu'à réaction alcaline. On ajoute de l'eau jusqu'à dissolution complète du polysaccharide spécifique; les substances non dissoutes sont séparées par centrifugation et rejetées. La solution transparente en quantité de 100 à 125 cent. cubes est additionnée de 10 grammes d'acétate de sodium; après dissolution du sel, on refroidit le liquide et on le précipite par 70 cent. cubes d'alcool refroidi. Le lendemain, on centrifuge à froid. Le culot additionné de 200 cent. cubes d'eau est centrifugé de nouveau. Le liquide transparent, acidifié par de l'acide acétique jusqu'à $\text{pH} = 3,4$, est séparé du précipité par une nouvelle centrifugation. Le polysaccharide ainsi obtenu est lavé dans 100 cent. cubes d'une solution 0,05 N d'acide acétique refroidi. Centrifugation. Lavage à l'alcool absolu, puis à l'acétone distillée, filtration sur entonnoir de Buchner, de nouveau lavage à l'acétone absolu. Séchage dans le vide à la température du laboratoire.

Le polysaccharide spécifique du pneumocoque de type II fut préparé suivant la méthode classique, non modifiée, de Avery et Heidelberger. Les 2 polysaccharides obtenus égalaient par leurs propriétés les meilleures préparations des auteurs américains.

RÉACTION DE PRÉCIPITATION PAR LE POLYSACCHARIDE SPÉCIFIQUE.

Le polysaccharide était toujours employé à la dilution de 1/10.000. 0 c. c. 25 de dilutions décroissantes de sérum, additionnées d'un volume égal de polysaccharide, étaient laissées deux heures à l'étuve et ensuite pendant vingt heures environ à la glacière. Les dilutions (sérum et polysaccharide) ont été faites avec de l'eau physiologique. Tous les essais ont été faits en double. On notait les résultats pour la première fois après deux heures d'étuve, la lecture définitive avait lieu le lendemain.

Les résultats étaient évalués comme il suit :

- +++ précipitation très nette à grands flocons;
- ++ précipitation nettement visible;
- + petits flocons, à peine visibles à l'œil nu;
- absence de réaction.

Le titre du sérum était représenté par la dilution maxima du sérum qui provoquait une précipitation évaluée au moins en ++.

Le titrage de chaque sérum était toujours accompagné d'un essai parallèle avec le sérum étalon, dont la valeur précipitante

TABLEAU I. — Titrage comparatif de différents anticorps dans les sérums du type I.

NUMÉROS	SÉRUMS	SÉRIE	QUANTITÉ D'ANTICORPS dans 1 cent. cube de sérum				
			Titre préventif en unités	Titre précipitant	Quantité d'azote dans le précipité spécifique en milligrammes	Titre agglutinant	Titre bactériotrope
1	Sérum thérapeutique concentré, monoval.	21	3.600	360		3.400	
2	Sérum agglutinant.	7	1.800	170	1,140	1.000	400
3	Sérum agglutinant.	494-1	1.200	120	1,444	800	300
4	Sérum thérapeutique bival. I et II.	6.321	400	40	0,710	200	50
5	Sérum thérapeutique monoval.	493	300	30	0,324	150	50
6	Sérum thérapeutique monoval.	3	200	20	0,218	180	30
7	Sérum thérapeutique monoval.	1	150	15	0,134	140	25
8	Sérum thérapeutique monoval.	40	80	8	0,084	0	15
9	Sérum thérapeutique monoval.	33	80	8		2	10
10	Sérum thérapeutique bival. I et II.		75	3	0,106	40	20
11	Sérum thérapeutique monoval.	38	50	3	0,044	0	0
12	Sérum thérapeutique monoval.	35	40	4	0,056	0	0
13	Sérum thérapeutique bival. I et II.	30	20	2	0,044	2	5
14	Sérum thérapeutique monoval.	31	20	2	0,016	4	0

TABLEAU II. — Titrage comparatif de différents anticorps dans les sérums du type II.

NUMÉROS	SÉRUMS	SÉRIE	QUANTITÉ D'ANTICORPS dans 1 cent. cube de sérum				
			Titre prévenlin en unités	Titre précipitant	Quantité d'azote dans le précipité spécifique en milligrammes	Titre agglutinant	Titre bactériotrope
1	Sérum agglutinant.	9	100	40	0,336	160	80
2	Sérum agglutinant.	939	53	20	0,218	120	40
3	Sérum agglutinant.	153-1	50	20	0,162	40	20
4	Sérum thérapeutique bival. I et II.		40	0	0	5	0
5	Sérum thérapeutique bival. I et II.	6.321	10	0	0	5	0
6	Sérum thérapeutique monoval.	34	0	0		4	0
7	Sérum thérapeutique monoval.	48	0	0	0,020	2	0
8	Sérum thérapeutique monoval.	43	0	0	0	6	0
9	Sérum thérapeutique monoval.	44	0	0	0	2	0

avait été déterminée soigneusement d'avance plusieurs fois ; elle était égale à $1/30$ pour le sérum étalon de type I et à $1/40$ pour celui du type II.

Les tableaux I et II représentent les titres de tous les sérums dont nous avons évalué le titre suivant la méthode que nous venons de décrire.

LA DÉTERMINATION DE L'AZOTE DANS LE PRÉCIPITÉ SPÉCIFIQUE (d'après Heidelberg, Sia et Kendall).

La méthode consiste à évaluer par micro-analyse la quantité d'azote contenue dans un précipité qu'on obtient en faisant agir sur un volume donné de sérum non dilué une quantité déterminée de polysaccharide en concentration constante.

En voici la technique :

On verse dans 2 tubes à essai stériles (l'expérience est faite en double) 0 c. c. 5 de sérum, 1 cent. cube de solution physiologique et 0 c. c. 5 de polysaccharide dilué dans du liquide physiologique dans la proportion de $1/1.000$, de sorte que le volume total contenu dans chaque tube soit égal à 2 cent. cubes. Les tubes fermés par des bouchons stériles sont soigneusement agités et placés pendant deux heures à l'étuve et ensuite à la glacière. Le lendemain, on centrifuge à froid pendant dix minutes à petite vitesse (1.000 tours par minute) et on enlève complètement le liquide surnageant. Les éprouvettes sont ensuite mises dans de l'eau glacée et le précipité lavé par 2 cent. cubes d'une solution à $1/20.000$ de polysaccharide spécifique. On mélange bien le contenu en ayant soin de détacher le culot du fond des tubes. Ceux-ci sont placés pendant une demi-heure à la glacière. Nouvelle centrifugation avec élimination du liquide surnageant. On verse dans chaque tube 0 c. c. 5 d'eau distillée, on agite le liquide jusqu'à ce que le précipité détaché du fond forme une suspension homogène ; II gouttes de NaOH normale ajoutées à ces émulsions amènent après agitation la dissolution complète du précipité.

Les dilutions sont transportées dans des ballons de Kjeldahl pour micro-analyse ; la quantité d'azote est évaluée, d'après n'importe quelle méthode (nous nous sommes servis de la méthode de Pregl). La quantité d'azote trouvée, multipliée par 6,25 représente la teneur en protéine spécifique précipitée.

Les résultats de nos expériences (21 sérums) sont représentés sur les tableaux I et II.

ÉVALUATION DES AGGLUTININES DANS LES SÉRUMS.

La technique de l'agglutination a été celle dont on se sert d'habitude.

On versait dans un tube à essai 0 c. c. 5 de chaque dilution; on y introduisait ensuite 0 c. c. 1 d'une culture de dix-huit heures de nos souches virulentes de pneumocoques (standardisés); le tout était laissé deux heures à l'étuve et ensuite dix-huit à vingt heures à la température du laboratoire.

Les résultats ont été évalués de la façon suivante :

- +++ précipitation intense, liquide surnageant clair;
- ++ agglutination bien visible à l'œil nu;
- + agglutination à peine visible à l'œil nu;
- absence de réaction.

Le titre agglutinant était représenté par la dilution maxima qui montrait une agglutination évaluée au moins par ++.

Les titres des sérums étudiés sont représentés sur les tableaux I et II.

DÉTERMINATION DES BACTÉRIOTROPINES DANS LES SÉRUMS.

Pour déterminer le pouvoir bactériotrope des sérums, nous avons opéré suivant la méthode de Neufeld et Boenck : des quantités décroissantes de sérums sont additionnées de pneumocoques et de leucocytes et placées un certain temps à l'étuve à 37°. Des frottis colorés sont préparés avec le contenu de chaque tube et on détermine au microscope la dilution maxima qui présente, par comparaison avec le sérum normal, une phagocytose marquée.

Voici les détails de l'expérience :

Un cobaye de 300-350 grammes reçoit, en injection intrapéritonéale, 10 cent. cubes de bouillon stérile chauffé à 37°. L'animal est tué quinze à dix-huit heures après l'injection; le péritoine est lavé à l'eau physiologique stérile chauffé à 37° et additionnée de citrate de sodium (solution à 0,1 p. 100). L'exsudat aspiré est lavé deux fois avec la solution physiologique et centrifugé à très petite vitesse. Le précipité leucocytaire est émulsionné dans le liquide physiologique, chauffé à 37° et amené à l'opacité d'un test de léci-thine diluée à 1 : 3; 0,1 cent. cube de dilutions décroissantes de sérum à titrer est introduit dans des tubes à essai; on se sert comme contrôle d'un tube avec 0,1 cent. cube de sérum normal en dilution égale à la plus petite dilution du sérum à titrer.

On ajoute ensuite 1 goutte de culture de dix-huit heures de pneumocoque

homologue au sérum étudié et II gouttes de l'émulsion leucocytaire. Les tubes sont bien agités et laissés à l'étuve quarante-cinq minutes. Pendant le premier quart d'heure, on agite plusieurs fois les tubes. Après quarante-cinq minutes, le liquide surnageant est aspiré d'abord avec une pipette et ensuite avec du papier filtre; on répartit le reste avec une anse en platine sur lame de verre, on fixe les préparations à l'alcool-éther et on les colore au bleu de méthylène dilué.

Les lames sont soigneusement étudiées et les résultats notés de la manière suivante :

+++ phagocytose très intense : la majorité des leucocytes est bourrée de cocci; des pneumocoques libres se rencontrent par exception.

++ phagocytose intense : la majorité des leucocytes contient des pneumocoques, mais pas en quantité très grande. Les cocci libres se rencontrent en nombre considérable.

+ phagocytose à peine marquée : quelques leucocytes contiennent des pneumocoques en petit nombre. La plupart des cocci sont libres en dehors des leucocytes.

— absence de phagocytose.

Le titre bactériotrope était représenté par la dilution maxima qui provoquait une phagocytose évaluée au moins en ++. Chaque titrage de sérum inconnu était accompagné des tubes de contrôle avec le sérum étalon, dont le titre bactériotrope était préalablement déterminé par des titrages multiples.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES.

Les tableaux I et II montrent les valeurs quantitatives des différents anticorps contenus dans nos sérums.

Sur ces tableaux, les sérums sont disposés suivant leurs titres préventifs décroissants. Le titre des anticorps est représenté par la quantité d'anticorps contenue dans 1 cent. cube de sérum.

Comme il ressort de ces tableaux, les quantités d'anticorps dans les sérums augmentent lorsque leurs titres préventifs montrent que plus le pouvoir prophylactique est grand, plus les valeurs des autres anticorps augmentent, et plus il diminue, plus les autres valeurs sont petites et même nulles. C'est ainsi que plusieurs sérums du type II, dont le pouvoir prophylactique était nul, étaient également dénués de toute

(1) Les titres (dans 1 cent. cube) précipitant, agglutinant et bactériotrope des sérums seront donnés par le dénominateur d'une fraction, qui représente la dilution maxima du sérum provoquant une réaction d'immunité bien caractérisée.

action agglutinante, précipitante et bactériotrope. Or, une question se pose : est-il possible de juger, d'après ces derniers titres, du pouvoir préventif d'un sérum ou, autrement dit, l'augmentation des titres des anticorps est-elle en raison directe du pouvoir préventif? Pour répondre à cette question, il serait peut-être plus commode d'évaluer les différents titres des anticorps en unités préventives, en comparant les données que nous avons obtenues dans l'étude de nos sérums et celle des sérums étalons.

Pour déterminer ces valeurs, on peut s'adresser à la formule suivante :

$$U_e = U_x \frac{T_x}{T_e}$$

dans laquelle :

U_x = quantité d'unités préventives dans 1 cent. cube de sérum à étudier.

U_e = quantité d'unités préventives dans 1 cent. cube de sérum étalon.

T_x = titre d'anticorps donné dans 1 cent. cube de sérum à étudier.

T_e = titre d'anticorps donné dans 1 cent. cube de sérum étalon.

Pour notre sérum étalon du type I (série 493), les éléments de cette formule ont les valeurs que voici :

$U = 300$, T . précipit. = 30, T . azote spécif. = 0,324, T . agglut. = 150 et T . bactériotrope = 50. Pour le sérum étalon du type II (série 9), ces valeurs sont : $U = 100$, T . précipit. = 40, T . azote spécif. = 0,336, T . agglut = 160 et T . bactériotrope = 80.

En présence de ces données et des titres des anticorps dans un sérum à étudier, on peut, à l'aide de cette formule, évaluer la quantité d'unités préventives de tout sérum. Nous avons mis dans le tableau III les titres prophylactiques de nos sérums évalués d'une part par l'épreuve de protection chez les souris, d'autre part, par la recherche des anticorps et la substitution des données trouvées dans la formule citée plus haut.

En examinant ce tableau, on constate que les titres préventifs, trouvés *in vivo*, accusent une concordance presque parfaite avec ceux déterminés *in vitro* par la méthode de précipitation avec le polysaccharide spécifique. La concordance est presque absolue dans les sérums du type I. Les titres des trois sérums du type II, à pouvoir préventif assez grand, présentent également une concordance satisfaisante.

Moins bons sont les résultats obtenus dans les recherches

TABLEAU III. — Titres préventifs comparatifs, déterminés *in vivo* et calculés d'après les données des réactions immunologiques *in vitro*.

NUMÉROS	TITRES déterminés chez la souris en unités	TITRE PRÉVENTIFS calculés d'après les données des réactions immunologiques <i>in vitro</i> en unités			
		Titre précipitant	Dosage de l'azote dans le précipité spécifique	Titre agglutinant	Index bactériotrope

<i>Sérums du type I.</i>					
1	3.600	3.600		4.800	
2	1.800	1.700	1.055	2.000	2.400
3	1.200	1.200	1.337	1.600	1.800
4	400	400	637	400	300
5	300	300	300	300	300
6	200	200	201	360	180
7	150	150	124	280	150
8	80	80	77	0	90
9	80	80		4	60
10	75	50	98	80	120
11	50	50	40	0	0
12	40	40	51	0	0
13	20	20	40	4	30
14	20	20	15	8	0

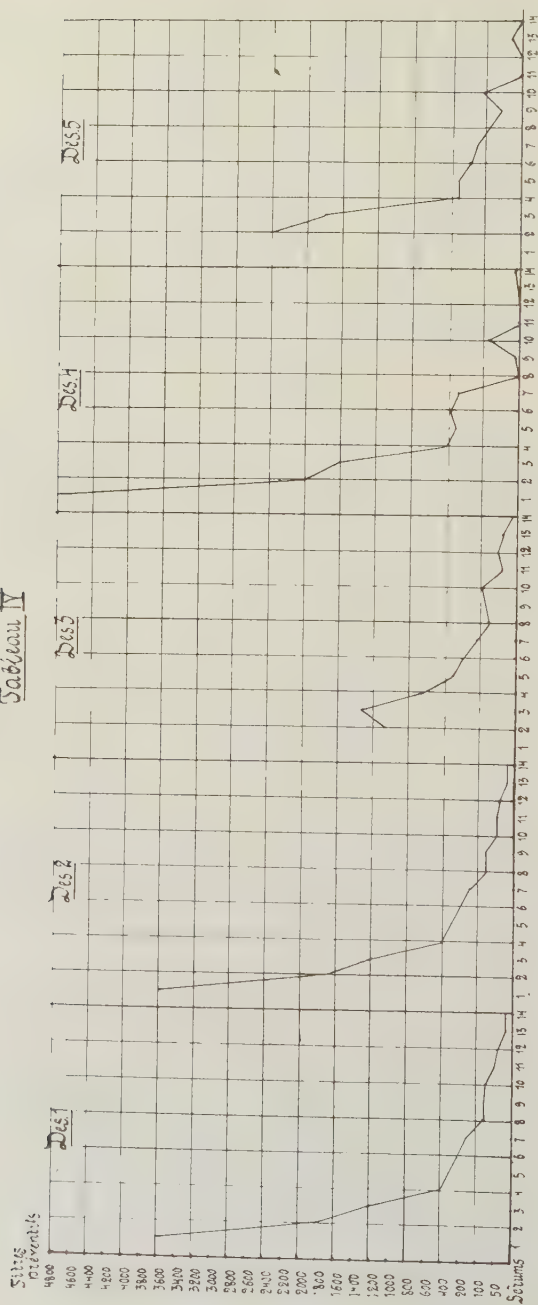
<i>Sérums du type II.</i>					
1	100	100	100	100	100
2	75	50	62	75	50
3	50	50	48	25	25

comparatives du titre préventif *in vivo* et par le dosage d'azote dans les précipités. Il en est de même du titre préventif calculé d'après les titres agglutinant et bactériotrope.

Donc, dans l'immunisation du cheval, l'augmentation des précipitines spécifiques est en raison directe de l'augmentation du pouvoir protecteur tandis que le titre des anticorps agglutinants et bactériotropes ne monte que parallèlement au titre préventif. Or, l'évaluation de l'effet curatif d'un sérum étant basé sur son pouvoir protecteur, la quantité d'agglutinines et de bactériotropines contenues dans le sérum ne peut pas servir pour juger de son efficacité.

Le tableau IV est une représentation graphique des résultats que nous avons obtenus.

Série IV



Le dessin n° 1 montre la courbe des titres préventifs des sérums du type I, obtenus par titrage *in vivo*; les autres représentent les courbes des titres préventifs de ces mêmes sérums calculés d'après les données des réactions immuno-biologiques. Il est facile de constater que la première courbe concorde en tous points avec la deuxième. Les trois dernières courbes, tout en montrant, dans leur allure générale, une certaine concordance s'éloignent notablement de la courbe n° 1.

Les résultats de nos expériences ont montré que la détermination du titre précipitant par rapport aux polysaccharides spécifiques peut servir de méthode de titrage commode des sérums antipneumococciques, la réaction de précipitation classique (détermination de la dilution maxima) étant de plus préférable au dosage de l'azote spécifique dans le précipité; cette dernière méthode étant beaucoup plus compliquée et moins précise. La réaction de précipitation telle que nous venons de l'exposer, peut remplacer avantageusement le titrage plus coûteux et plus compliqué du pouvoir antimicrobien chez la souris, au moins dans les titrages préalables des saignées d'épreuve.

RÉACTION DE PRÉCIPITATION AVEC LE POLYSACCHARIDE OBTENU PAR MÉTHODE SIMPLIFIÉE.

Les résultats que nous avons obtenus dans nos expériences nous ont incités à rechercher une méthode plus simple pour préparer le polysaccharide spécifique; les difficultés auxquelles on se heurte dans sa préparation pouvant présenter un obstacle sérieux dans l'évaluation du pouvoir curatif des sérums antipneumocoques par précipitation. Les recherches comparatives que nous avons poursuivies dans cette direction ont permis d'établir que le polysaccharide préparé d'une façon plus simple et plus rapide d'après les indications de Zozaya, Boyer et Clark, peut remplacer avec avantage celui de Avery et Heidelberger.

TECHNIQUE SIMPLIFIÉE DE PRÉPARATION DU POLYSACCHARIDE SPÉCIFIQUE (d'après Zozaya, Boyer et Clark). — Une culture de pneumocoques sur bouillon phosphaté, âgée de huit jours, est évaporée jusqu'au 1/15 de son volume initial. Cette solution est refroidie et précipitée par de l'acide trichloracétique cristallisé en quantité correspondant à 5 p. 100 du volume total. Ce précipité est rejeté après centrifugation immédiate; le liquide surnageant, trans

parent, d'un brun foncé, est additionné d'alcool en quantité égale à 1,5 de son volume. Le précipité obtenu contient le polysaccharide. Celui-ci est dissout dans l'eau et purifié par nouvelle précipitation à l'alcool. Enfin une dernière précipitation est produite par de l'acétone.

Le polysaccharide du type I ainsi préparé ne cédait à celui préparé par la méthode de Avery et Heidelberger ni par la quantité d'azote, ni par son titre précipitant; cependant son rendement était quatre fois plus considérable.

L'évaluation du titre des sérums du type I par comparaison avec les titres précipitants obtenus avec le produit préparé d'après la méthode de Heidelberger, Sia et Kendall a montré une concordance parfaite.

CONCLUSIONS.

1° La standardisation biologique des sérums antipneumococciques des types I et II par l'épreuve de protection chez la souris est très coûteuse et compliquée;

2° L'étude comparative des valeurs de différents anticorps, contenus dans les sérums antipneumococciques des types I et II en vue d'un titrage *in vitro* de ces sérums a permis de constater que :

a) La quantité de précipitines spécifiques dans un sérum antipneumococcique (par rapport aux polysaccharides) est en raison directe de son titre prophylactique; la quantité d'agglutinines et de bactériotropines, tout en augmentant lorsque s'élève le pouvoir préventif, ne lui est cependant pas directement proportionnelle.

b) La détermination du titre précipitant est une méthode commode, sûre et peu coûteuse de titrage des sérums antipneumococciques, elle est surtout à recommander dans les évaluations préalables.

c) La méthode classique (détermination de la dilution maxima) donne des résultats plus précis que le dosage de l'azote dans le précipité spécifique.

d) Dans le titrage des sérums antipneumococciques par précipitation on peut employer avec avantage le polysaccharide préparé d'après la méthode simple et rapide de Zozaya, Boyer et Clark.

BIBLIOGRAPHIE

1. AVERY, CHICKERING, COLE et DOCHEZ. *Monogr. Rockefeller Inst. med. Res.*, n° 7, 1917.
2. FELTON. *J. of Infect. Dis.*, **43**, 1928, p. 531.
3. FELTON. *J. of Immunol.* **21**, 1931, p. 341.
4. PARISH. *J. of Pathol. a. Bacteriol.*, **33**, 1930, p. 729.
5. TREVAN. *J. of Pathol. a. Bacteriol.*, **33**, 1930, p. 733.
6. BEARD et CLAPP. *J. of Immunol.*, **23**, 1932, p. 91.
7. SMITH. *J. of Pathol. a. Bacteriol.*, **35**, 1932, p. 509.
8. FRIEDLANDER, SOBOTKA et BANZHOF. *J. exp. Med.*, **47**, 1928, p. 79.
9. HEIDELRERGER et AVERY. *J. of exp. Med.*, **38**, 1923, p. 73.
10. ZOZAYA, BOYER et CLARK. *J. of exp. Med.*, **52**, 1930, p. 471.
11. HEIDELBERGER, SIA et KENDALL. *J. of exp. Med.*, **52**, 1930, p. 477.
12. R. BROWN. *J. of Immunol.*, **25**, 1933, p. 149.

ANALYSE DES RÉCEPTEURS DU VIBRION CHOLÉRIQUE ET DU VIBRION EL TOR

Par R.-TH. SCHOLTENS.

(*Institut d'Hygiène Tropicale de Leyden.*
Directeur : professeur P. C. FLU.)

La méthode de l'analyse des récepteurs, inaugurée par Weil et Félix, à propos de leurs recherches sur les souches *Proteus* X₁, X₂, X₁₀ a apporté beaucoup de lumière dans plusieurs questions sérologiques.

On peut dire que l'antigène d'un microbe est de nature complexe, si celui-ci stimule l'organisme animal à former des anticorps qualitativement différents, par exemple deux agglutinines de nature différente.

Les souches *Proteus* XH stimulent l'organisme animal à former deux agglutinines, l'une spécifique et agglutinant les souches XH en petits flocons, l'autre agglutinant ces souches en grands flocons et non spécifique. La preuve de la différence qualitative de ces agglutinines est donnée par des expériences d'absorption. Comme l'ont démontré Weil et Félix, on peut en absorbant avec une émulsion de bacilles de la forme XO faire baisser le titre pour la forme XO, tandis que le titre pour la forme XH reste à peu près identique. Or, le pouvoir agglutinant de ce sérum ne peut pas être lié à la même agglutinine; après absorption avec une souche XO, il reste une fraction dans le sérum qui n'a pas d'affinité pour la forme XO, mais qui agglutine la forme XH. Généralement, on peut dire que lorsque l'on peut enlever d'un sérum, en absorbant avec une certaine souche, le pouvoir agglutinant pour quelques souches, tandis que pour d'autres souches le titre n'est pas influencé, les pouvoirs agglutinants ne peuvent pas être liés à la même agglutinine. Après les résultats obtenus avec les souches *Proteus*, ce fut d'abord dans le groupe des *Salmonella* que la

méthode de l'analyse des récepteurs trouva son application.

Plusieurs auteurs comme Shousha et Balteanu se sont prononcés pour la présence d'un récepteur thermostable dans le groupe des vibrions, tandis que d'autres, comme Brutsearts, le niaient. On peut démontrer l'absence d'un récepteur thermolabile en démontrant un même abaissement de titre après l'absorption par deux émulsions de même densité, l'une chauffée et l'autre non chauffée, en déterminant le titre du sérum avec des émulsions de vibrions non chauffées.

J'ai travaillé avec les souches suivantes : Ch. 130 et Ch. 129, isolées à Batavia en 1927; Ch. 43 et Ch. 44, isolées à Batavia par Flu en 1914; R. A. K. et T. H. F., isolées en Irak; El Tor A, qui donna naissance à la question El Tor en 1905, isolée par Gottschlich, et les souches El Tor 6 et El Tor 47 rough et smooth, isolées par Doorenbos en 1930.

J'absorbais les agglutinines d'un sérum préparé avec Ch. 130 par deux émulsions de R. A. K. de même densité, l'une chauffée et l'autre non chauffée. Le titre fut déterminé avec R. A. K. et El Tor 47 rough. Le résultat est donné dans le tableau I.

TABLEAU I. — Sérum Ch. 130 titré avec R. A. K. et El Tor 47 rough, avant et après absorption avec R. A. K.

TITRÉ AVEC	DILUTIONS					
	1/100	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800
<i>Sérum Ch. 130 avant toute absorption :</i>						
El Tor 47 rough. .	++++	++++	++++	++++	++++	++
R. A. K.	++++	++++	++++	++++	++	—
<i>Sérum Ch. 130 après absorption par une émulsion de R. A. K. non chauffée :</i>						
El Tor 47 rough. .	++	++++	++++	++++	++	—
R. A. K.	++	—	—	—	—	—
<i>Sérum Ch. 130 après absorption avec une émulsion de R. A. K. chauffée à 100° pendant deux heures :</i>						
El Tor 47 rough. .	+	++	+++	+++	++	—
R. A. K.	—	—	—	—	—	—

Les émulsions, chauffée et non chauffée, ont produit le même effet. Seulement l'antithèse entre la disparition presque

complète du pouvoir agglutinant pour R. A. K. et le changement comparativement minime du titre pour El Tor 47 rough était inexplicable. Le titre pour R. A. K. s'était abaissé plus de quinze fois et pour El Tor 47 rough deux fois au plus. Ce fait est inexplicable en acceptant la présence d'une seule agglutinine homogène dans le sérum Ch. 130 qui agglutinerait les souches Ch. 130 et R. A. K. quantitativement différemment. Or, dans ce cas, si par absorption d'une partie de cette agglutinine homogène, le titre pour R. A. K. s'abaisse plus de quinze fois, le titre pour El Tor 47 rough s'abaisserait proportionnellement, ou à peu près jusqu'à 1/800.

Pour mieux démontrer l'influence minime de l'absorption avec R. A. K. sur le titre de sérum Ch. 130 pour El Tor 47 rough j'ai ajouté au liquide obtenu après la première absorption avec R. A. K. encore une fois la même émulsion de R. A. K. en quantité égale et j'ai centrifugé après un séjour d'une heure à l'étuve. Le résultat de la détermination du titre avec la souche El Tor 47 rough était conforme à celui du tableau I aussi bien qu'après un troisième contact avec l'émulsion de R. A. K. Du liquide obtenu après absorption avec R. A. K., il était facile d'absorber toutes les agglutinines avec la souche El Tor 47 rough. Dans le sérum Ch. 130, il existe donc une fraction d'agglutinine qui agglutine El Tor 47 rough, mais n'a pas d'affinité pour R. A. K. Cette fraction n'agglutine pas R. A. K. et ne peut pas être absorbée par R. A. K.

Maintenant, il faut examiner si le comportement de la souche El Tor 47 rough envers le sérum Ch. 130 avant et après l'absorption avec R. A. K. est aussi une propriété d'autres souches. En même temps, il sera nécessaire de s'assurer par une détermination plus exacte s'il y a abaissement de titre pour la souche El Tor 47 rough après absorption avec R. A. K. Dans ce but le sérum Ch. 130 était titré avec les souches et aux dilutions données dans le tableau II et III.

Dans le tableau II, on voit déjà les vibrions classés dans deux groupes, l'un agglutiné jusqu'à 1/20.000, l'autre agglutiné jusqu'à 1/12.000 comme R. A. K. Après absorption avec R. A. K. les différences s'accroissent, le titre pour l'un des groupes s'abaisse fort peu, tandis que le pouvoir agglutinant pour l'autre des groupes disparaît à peu près tout à fait.

TABLEAU II. — Sérum Ch. 130 titré avec les souches indiquées avant toute absorption.

TITRÉ AVEC	DILUTIONS							
	1/2.000	1/3.000	1/4.000	1/6.000	1/8.000	1/10.000	1/14.000	1/20.000
El Tor 47 smooth.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
El Tor 47 rough.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
El Tor 6.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Ch. 130.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Ch. 129.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
R. A. K.	+++	+++	+++	++	++	—	—	—
T. H. F.	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
Ch. 44.	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
Ch. 43.	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—
El Tor A.	+++	+++	+++	—	—	—	—	—

Dans un deuxième et troisième contact avec R. A. K., le titre ne s'abaisse plus du tout. C'est la preuve que cette fraction d'agglutinine n'a pas d'affinité pour R. A. K., de ce fait, ces agglutinines diffèrent qualitativement de celles qui ont été absorbées par R. A. K. Ces dernières avaient de l'affinité pour R. A. K., car elles agglutinaient cette souche et étaient absorbées par elle. On peut conclure que le sérum Ch. 130 contient deux agglutinines qualitativement différentes, toutes les deux à un titre très élevé.

TABLEAU III. — Sérum Ch. 130 titré avec les mêmes souches après absorption avec R. A. K.

TITRÉ AVEC	DILUTIONS							
	1/200	1/400	1/1.000	1/3.000	1/4.000	1/6.000	1/8.000	1/10.000
El Tor 47 smooth.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
El Tor 47 rough.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
El Tor 6.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Ch. 130.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Ch. 129.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Ch. 44.	—	—	—	—	—	—	—	—
Ch. 43.	—	—	—	—	—	—	—	—
T. H. F.	+	—	—	—	—	—	—	—
R. A. K.	—	—	—	—	—	—	—	—
El Tor A.	—	—	—	—	—	—	—	—

La question qui se pose maintenant est : comment se comportent les agglutinines du sérum Ch. 130 quand on les absorbe avec chacune des souches du tableau II. Dans des expériences analogues à celles décrites ci-dessus, les souches Ch. 43, Ch. 44, T. H. F. et Tor A se comportaient comme la souche R. A. K. ; elles absorbaient toutes les agglutinines de leur groupe, mais ne faisaient qu'abaisser le titre pour les souches Ch. 130, El Tor 47 rough, etc. Cette absorption était quantitativement égale à l'abaissement de titre causé par R. A. K. Toutes ces souches n'étaient capables que d'absorber une seule agglutinine.

Le sérum Ch. 130 contient d'abord une agglutinine qui floccule toutes les souches du vibron cholérique. Je l'appellerai l'agglutinine A ; puis une agglutinine qui ne floccule que quelques souches, à peu près la moitié des souches examinées ci-dessus. Je l'appellerai l'agglutinine B.

Est-ce que toutes les souches qui sont agglutinées par l'agglutinine B peuvent aussi la former ? Pour répondre à cette question j'ai examiné des sérums préparés avec chacune des souches du tableau III.

Les sérums préparés avec les souches qui se laissaient agglutiner par les deux agglutinines contenues dans le sérum Ch. 130 provoquaient la formation de ces deux agglutinines chez le lapin, sauf la souche Ch. 129 qui ne provoquait que l'agglutinine A, quoique trois lapins fussent injectés avec cette souche et quoique l'agglutinine fut recherché jusqu'au titre 1/50, à partir duquel les agglutinines normales commencent déjà à développer leur action. Les souches qui, dans les expériences d'agglutination et d'absorption ne montrèrent qu'une affinité que pour l'agglutinine A ne provoquèrent que la formation de l'agglutinine A. En résumé, on peut dire, en utilisant la nomenclature d'Ehrlich (nomenclature généralement adoptée par Weil, Félix, Sachs et d'autres auteurs) que les souches Ch. 130, El Tor 47 rough et smooth et El Tor 6 possèdent deux récepteurs, que j'appellerai les récepteurs A' et B'. Les souches R. A. K., T. H. F., Ch. 44, Ch. 43 et Tor A ne possèdent que le récepteur A'. La souche Ch. 129 possède le récepteur A' et l'haptène du récepteur B'. Ici l'haptène se trouve donc séparé de la matière antigène dans un microbe. La souche Ch. 129 prend donc une place non simplement intermédiaire mais toute spéciale. Cette souche est

en outre beaucoup moins bien agglutinée par l'agglutinine B que les souches Tor 6, Ch. 130 et El Tor 47 rough, comme on le voit dans les tableaux II et IV.

Le tableau IV donne le résultat du titrage de tous les sérums à deux agglutinines examinés avec les souches à deux récepteurs, à un seul récepteur et avec le type intermédiaire Ch.129, avant et après absorption de l'agglutinine A.

TABLEAU IV.

SÉRUM	AVANT TOUTE ABSORPTION TITRÉ AVEC			APRÈS ABSORPTION avec une souche à un seul récepteur A titré avec une souche aux récepteurs A et B
	Souches à deux récepteurs A et B	Souches à un seul récepteur A	Type intermédiaire Ch.129 avec récepteur A et haptène B	
Ch.130 I	1/20.000	1/8.000	1/8.000	1/12.000
Ch.130 II	1/6.000	1/2.500	1/2.500	1/3.000
Ch.130 III	1/1.600	1/1.600	1/1.600	1/200
Ch.130 IV	1/4.000	1/400	1/1.000	1/4.000
El Tor 47 I	1/4.000	1/400	1/1.000	1/4.000
El Tor 47 II	1/2.500	1/400	1/1.000	1/2.500
El Tor 6	1/4.000	1/2.000	1/2.000	1/2.000

Il nous reste à répondre à deux questions. Pourquoi les sérums à deux agglutinines flocculent-ils les souches à deux récepteurs jusqu'à un titre beaucoup plus élevé que les souches à un récepteur? Et pourquoi ce titre diminue-t-il quand l'agglutinine A est enlevé?

C'est que le titre qu'on mesure avec les souches aux récepteurs A' et B' est la somme du titre de l'agglutinine A et du titre de l'agglutinine B, forcément plus élevé que le titre de l'agglutinine A, qu'on obtient en titrant avec une souche à un seul récepteur. (Les sérums qui ne contiennent qu'une seule agglutinine ont à peu près le même titre pour tous les vibrions cholériques [Tableau V]). En enlevant l'agglutinine A on obtient le titre de l'agglutinine B, forcément plus bas que le titre avant l'absorption.

Il reste à examiner si les récepteurs sont thermostabiles. Ils le sont parce que des émulsions chauffées à 100° pendant deux heures se laissent agglutiner par l'agglutinine A aussi bien que

TABLEAU V. — Sérum Ch. 43 avant toute absorption.
Sérum à une seule agglutinine.

TITRÉ AVEC	DILUTIONS						
	1/2 000	1/3 000	1/4 000	1/5 000	1/6.000	1/8.000	1/10 000
El Tor 47 smooth	+++	+++	+++	+++	++	+	—
El Tor 47 rough	+++	+++	+++	+++	++	++	—
El Tor 6	+++	+++	+++	+++	++	++	—
Ch. 130	+++	+++	+++	+++	++	++	—
Ch. 129	+++	+++	+++	+++	+++	+	—
R. A. K.	+++	+++	+++	++	++	++	—
T. H. F.	+++	+++	+++	++	++	+	—
Ch. 44	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
Ch. 43	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
El Tor A	+++	+++	+++	+	—	—	—

par l'agglutinine B, absorbent les deux agglutinines et provoquent la formation de ces deux agglutinines après injection au lapin.

J'ai examiné plusieurs autres souches de vibrion cholérique quant à leurs récepteurs A' et B'. Sur six souches de vibrions cholériques, deux possédaient deux récepteurs; sur douze souches hémolytiques, onze se laissaient agglutiner par l'agglutinine B.

La transformation dans la forme rough n'avait pas d'influence sauf dans le cas de la souche Ch. 129. La souche Ch. 129 rough était encore moins bien agglutinable par l'agglutinine B.

CONCLUSIONS.

1° Certains sérums agglutinant le vibrion cholérique contiennent deux agglutinines actives jusqu'à un très haut titre;

2° L'une agglutine tous les vibrions, elle est appelée l'agglutinine A. L'autre n'agglutine qu'un tiers des vibrions, c'est l'agglutinine B;

3° Tous les deux provoquent une agglutination de même aspect;

4° Seules les souches agglutinées par les deux agglutinines provoquaient la formation de ces deux agglutinines;

5° Une souche agglutinée par les deux agglutinines ne possédait qu'un seul antigène;

6° Les deux récepteurs sont thermostables ;

7° Les deux types immunologiques ont été trouvés l'un à côté de l'autre dans deux épidémies ;

8° Parmi les soi-disant vibrions El Tor, se trouvent les deux types immunologiques. En ceci ils sont identiques aux vibrions cholériques.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES PROPRIÉTÉS ANTIGÈNES DE L'ANAVACCIN ANTITYPHIQUE

par N. N. SPASSKY et L. A. DANENFELD.

(*Institut Bactériologique de Kiew.*)

La méthode de Ramon pour la préparation des anatoxines par l'action combinée sur les toxines du formol et de la température fut appliquée dans ces dernières années pour la préparation des anavaccins. Patané (1931), et Zdrodovsky (1933), ont prouvé, les premiers, la possibilité d'obtenir par cette méthode des vaccins antitypho-paratyphiques produisant une faible réaction.

Dans les premiers six mois de l'année 1932, plus de 400.000 personnes furent vaccinées à Léningrad par l'anavaccin antitypho-paratyphique.

Le but du présent travail est d'étudier expérimentalement les propriétés antigènes de cet anavaccin.

Les travaux de cet ordre sont très contradictoires chez les différents auteurs. Belawzen et ses collaborateurs, Wyschelski, Bytschkow et Doubovine, Kosmodemyanski et Faibitch et Palowandow avec ses collaborateurs, trouvent que les propriétés antigènes de l'anavaccin sont plus prononcées que celles des vaccins ordinaires (préparés par chauffage). Boudakow, Romanenko et Tokarevitch, Nossow, Jaremenko, Filippowa, Kourдумowa et Semitchewa et Timakow, arrivent à une conclusion opposée, notamment que les anavaccins sont de moins bons antigènes que les vaccins.

MATÉRIEL ET MÉTHODE D'IMMUNISATION DES ANIMAUX.

Toutes nos expériences furent exécutées avec l'anavaccin, préparé d'après la prescription originale de M. le professeur Zdrodowsky. A une suspension de 40 milliards de germes en

eau physiologique d'une culture de vingt-quatre heures de bacilles d'Eberth sur gélose sont ajoutés à 0 c. c. 5 de formol et ce mélange est placé à l'étuve à 39° pendant trente jours. Après ce temps, on ajoute à l'anavaccin de l'ammoniaque liquide en quantité strictement nécessaire pour la neutralisation du formol libre (il se forme de l'urotropine).

La suspension-mère de l'anavaccin est diluée avec de l'eau physiologique jusqu'à ce qu'elle contienne 1 milliard de microbes par 1 cent. cube. Pour conserver l'anavaccin, on y ajoute encore 0,5 p. 100 de phénol. Comme souche microbienne nous nous sommes servis d'une culture de bacilles typhiques de notre collection n° 203, étudiée en détail par M. le D^r Basilewski. Elle représente, par ses propriétés morphologiques, antigènes et biochimiques, une race pure du type S.

A titre de contrôle nous avons pris un vaccin préparé comme d'ordinaire avec la même souche (chauffage à 56° pendant une heure; le phénol y fut ajouté à 0,5 p. 100).

Pour l'immunisation, 24 lapins pesant chacun de 1.500 à 2.000 grammes ont été employés.

Nous avons introduit l'anavaccin sous la peau.

10 lapins reçurent trois injections d'anavaccin dosées à 0 c. c. 5, 1 cent. cube et 1 cent. cube tous les cinq jours. 7 lapins reçurent 2 c. c. 5 d'anavaccin, 7 lapins furent injectés en même temps que ceux de la première série avec du vaccin antityphique ordinaire. Aucune réaction notable (fièvre, œdèmes, perte de poids) ne fut observée durant toute l'immunisation.

AGGLUTINATION.

Pour l'étude des agglutinines nous prélevâmes le sang trois fois aux dixième, vingtième et trentième jours après la dernière injection. La réaction d'agglutination fut faite avec une culture vivante de bacilles d'Eberth pour fixer le taux des agglutinines flagellaires et avec une culture traitée par l'alcool (Bien) pour déterminer le taux des agglutinines somatiques. Le tableau I résume les résultats obtenus.

Il démontre qu'il y eut dans tous les cas plus d'antigènes flagellaires que d'antigènes somatiques. Le vaccin antityphique ordinaire stimulait une production un peu plus considérable

TABLEAU I.

LAPINS IMMUNISÉS PAR

l'anavaccin 3 fois		l'anavaccin 1 fois		le vaccin 3 fois	
H (1)	O	H	O	H	O
200 (2)	880	400	160	300	320
200	320	300	640	860	320
		600	40		
290	40	600	40	300	320
200	640	406	10	1.200	320
50	20	300	80	150	80
300	160	400	160	400	320
200	640	400	160	800	320
150	10	400	80	200	80
1.200	320	800	320	300	640
1.200	640	300	80	1.200	320
150	20	1.160	80	300	640
400	160	400	80	1.200	640
600	640	400	80	1.200	640
100	20	800	160		
600	640	150	320	400	10
600	320	300	640		
100	10	300	640		
200	320	150	40	200	640
300	320	400	640	600	320
100	40	400	160	150	80
8.800	320				
800	320				
400	320				
300	320				
800	640				
150	160				

d'agglutinines II, tandis que la production des agglutinines O se faisait après les trois injections de l'anavaccin dans les mêmes proportions qu'après l'immunisation avec le vaccin ordinaire. La production d'agglutinines II atteint son taux le plus haut le vingtième jour, aussi bien chez les lapins immunisés par l'anavaccin que par le vaccin ordinaire.

La production des agglutinines O chez les lapins immunisés

(1) La colonne II contient les données se rapportant aux agglutinines flagellaires et la colonne O aux agglutinines somatiques.

(2) Les chiffres du premier rang donnent la dilution maximale du sérum du sang prélevé dix jours après l'immunisation, celles du second rang, avec le sérum prélevé vingt jours après et celles du troisième rang, avec le sérum prélevé trente jours après l'immunisation.

par le vaccin ordinaire est maximale au dixième jour, tandis que chez les lapins ayant reçu l'anavaccin le maximum est atteint au vingtième jour.

Au trentième jour, on constate dans tous les cas un affaiblissement considérable des agglutinines H et O.

RÉACTION DE FIXATION DE COMPLÉMENT.

La réaction de fixation de complément fut faite dix, vingt et trente jours après la dernière injection. Comme antigène, nous nous sommes servis d'une suspension de culture vivante de bacilles d'Eberth de la même souche employée pour la préparation du vaccin.

L'antigène, le complément et l'ambocepteur furent titrés comme à l'ordinaire. Les résultats sont résumés dans le tableau II.

Ce tableau prouve qu'il n'existe pas de différence considérable dans le caractère de la réaction de fixation de complément chez les lapins immunisés par l'anavaccin et le vaccin ordinaire antityphique. L'épreuve faite avec des sérums à un taux faible ne donne pas de résultats nets.

BACTÉRIOLYSE.

Les substances bactéricides furent recherchées par la méthode de Neisser-Wechsberg dans le sérum du sang prélevé dix jours après l'immunisation. Les résultats les plus démonstratifs furent obtenus, avec les sérums dilués, à 1 : 100 (tableau III).

TABLEAU III.

LAPINS IMMUNISÉS PAR

		l'anavaccin 3 fois	l'anavaccin 1 fois	le vaccin 3 fois
Nombre des colonies.	{	16	47	9
		23	40	10
		45	51	8
		27	73	12
		16	74	11
		34	36	»
		6	24	»
		20	»	»
		8	»	»
En moyenne :		22	49	10

Les expériences témoins, faites avec le sérum normal et l'eau physiologique donnèrent une culture très riche. La durée de l'expérience fut de quatre heures à 37°. La dilution du complément fut de 1/20, celle de la culture en bouillon de vingt-quatre heures, de 1/5.000.

On s'aperçoit, en examinant le tableau III, que le sérum des lapins immunisés par l'anavaccin antityphique possède des propriétés bactéricides très prononcées. Néanmoins, dans nos expériences, l'effet bactéricide fut un peu plus fort pour les sérums des lapins immunisés avec le vaccin ordinaire.

PRÉCIPITATION DES POLYSACCHARIDES SPÉCIFIQUES.

Il a été établi, par les travaux d'Arkwright, White, Topley et Ayrton qu'en perdant leurs polysaccharides spécifiques, les cultures typhiques virulentes du type S donnent des formes non virulentes du type R. C'est pourquoi il est très probable que, dans l'infection typhique, un grand rôle revient aux anticorps dirigés contre les polysaccharides des formes virulentes du type S, ainsi que cela a été établi pour les pneumococcies.

Chez les bacilles du groupe coli-typhus, les polysaccharides sont, à ce qu'il semble, disposés à l'extérieur de la partie somatique; les variantes S immobiles, ayant perdu leurs cils vibratiles, mais ayant conservé leurs polysaccharides, possèdent une pleine virulence (Topley).

Ce fait nous porta à inclure la réaction de précipitation des polysaccharides dans notre étude des propriétés antigènes de l'anavaccin antityphique et du vaccin antityphique ordinaire. Comme antigène, nous prîmes un polysaccharide obtenu de la même souche de bacille d'Eberth qui nous avait servi pour la préparation du vaccin.

Le polysaccharide spécifique des bacilles d'Eberth fut obtenu par la méthode suivante : on préparait une suspension de cultures de vingt-quatre heures en eau distillée et on la clarifiait par ébullition en présence de soude; le polysaccharide était ensuite précipité par l'alcool et, pour la libérer des restes d'amines, on le lavait avec des solutions faibles d'acide acétique et de soude (Basilewsky).

Les résultats sont donnés dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Taux des polysaccharides dans la réaction de précipitation avec le sérum de lapins immunisés par l'anavaccin et par le vaccin ordinaire antityphiques.

ANAVACCIN 3 fois	ANAVACCIN 1 fois	VACCIN 3 fois
100.000	80.000	40.000
80.000	20.000	40.000
10.000	10.000	20.000
4.000	10.000	20.000
4.000	10.000	10.000
4.000	4.000	4.000
2.000	4.000	»
2.000	»	»
En moyenne : 25.000	20.000	22.300

Le tableau IV démontre qu'en ce qui concerne la production des anticorps précipitant le polysaccharide spécifique du bacille d'Eberth, les lapins présentent des différences individuelles très prononcées. Certains chiffres montrent que les anavaccins, même injectés une seule fois, possèdent une faculté de stimuler la production des anticorps dirigés contre les polysaccharides spécifiques, non inférieure à celle des vaccins ordinaires.

Les chiffres moyens des taux de la réaction de précipitation sont à peu près égaux dans le cas de l'immunisation par l'anavaccin et par le vaccin antityphique.

RÉACTIONS ALLERGIQUES.

Kahn a créé, dans ces dernières années, une méthode d'évaluation quantitative de la sensibilisation de l'animal par rapport aux antigènes bactériens et autres, en employant les réactions cutanées.

Attribuant une signification fondamentale à l'état allergique des éléments cellulaires, nous entreprîmes, pour juger des qualités antigènes de cette espèce, les expériences que voici :

9 lapins reçurent chacun cinq injections de quantités différentes (500.000.000; 50.000.000; 5.000.000; 500.000 et 50.000) de corps microbiens d'anavaccin dans la peau du dos et en même temps cinq injections à la même dose de vaccin ordinaire.

Vingt-quatre heures après, 7 lapins reçurent une injection intraveineuse du vaccin ordinaire, antityphique à 6.000.000.000 de corps microbiens par kilogramme du poids et 2 lapins reçurent la même quantité d'anavaccin.

Six heures après les injections intraveineuses, 7 lapins donnèrent des réactions cutanées inflammatoires aux points d'inoculation (aussi bien de l'anavaccin que du vaccin), 2 lapins ne donnèrent point de réaction.

Les réactions les plus prononcées furent suivies de nécrose.

Pour arriver à un jugement précis, nous fîmes, à l'aide d'un compas, la mensuration du plus grand diamètre des foyers nécrotiques et nous calculâmes, pour chaque lapin, le montant de toutes les mensurations, qui donnait en millimètres la dimension du diamètre général de tous les foyers nécrotiques, pour l'anavaccin et le vaccin (tableau V).

TABLEAU V.

	LAPINS SENSIBILISÉS PAR	
	l'anavaccin	le vaccin
Réaction provoquée par l'injection du vaccin, (diamètre des nécroses, en millimètres). . . .	53	90
	32	32
	53	"
	19	"
	66	"
Réactions provoquée par l'injection d'anavaccin; (diamètre des nécroses, en millimètres). . . .	42	"
	20	41

Ce tableau montre que les propriétés sensibilisantes de l'anavaccin ne sont pas moindres que celles du vaccin.

Dans nos expériences, nous eûmes même une réaction allergique cutanée plus forte après la sensibilisation par l'anavaccin, qu'on ait injecté ultérieurement le vaccin ou l'anavaccin. En général, la réaction allergique semble être plus faible après l'injection ultérieure de l'anavaccin, qu'on ait injecté préalablement l'anavaccin ou le vaccin.

LAPINS PORTEURS DE GERMES.

Maltaner, dans son travail récent sur l'immunité et la vaccination antityphiques, attira l'attention sur la valeur des anciennes expériences de Gay et de Claypol, qui rendaient les lapins porteurs de bacilles et se servaient de ce fait pour juger du degré de l'immunité.

Si on inocule au lapin par voie intraveineuse une certaine quantité de culture typhique, certains d'entre eux meurent. En ensemençant le sang de ces lapins à des temps différents, en les tuant ensuite et en ensemençant le contenu de la vésicule biliaire, il est possible de constater, dans un nombre de cas assez élevé, la présence de bacilles d'Eberth. Maltaner, en usant de cette méthode, put constater qu'à la suite de l'immunisation des lapins par les vaccins préparés avec des cultures du type R le nombre d'animaux donnant des résultats négatifs surpasse de beaucoup celui des animaux « négatifs » vaccinés par le type S.

Pour étudier, sous ce rapport, l'effet immunisant de l'anavaccin, nous effectuâmes les expériences suivantes :

8 lapins, immunisés trois fois par l'anavaccin, reçurent, cinquante jours après l'immunisation, 7.200.000 de microbes vivants dans les veines, de même que 5 lapins, immunisés une fois par l'anavaccin et 3 lapins immunisés par le vaccin (tableau VI).

TABLEAU VI.

IMMUNISATION par	MORTS après	TUÉS après (jours)	ENSEMENCEMENT du contenu	
			du cœur	de la bile
—	—	—	—	—
L'anavaccin.	—	6	+	+
L'anavaccin.	24	—	+	—
L'anavaccin.	—	6	—	—
L'anavaccin.	—	6	—	—
L'anavaccin.	—	6	—	+
L'anavaccin.	24	—	+	+
L'anavaccin.	—	6	—	—
L'anavaccin.	—	6	—	—
L'anavaccin.	24	—	+	—
L'anavaccin.	—	6	—	—
L'anavaccin.	—	6	—	—
L'anavaccin.	24	—	+	+
L'anavaccin.	—	6	—	—
L'anavaccin.	24	»	+	—
Vaccin	12	—	+	+
Vaccin	—	6	—	—
Vaccin	»	6	—	—

Le tableau VI montre que parmi les 6 lapins restés en vie et immunisés trois fois par l'anavaccin, 3 seulement devinrent porteurs de germes. Les 2 lapins, immunisés par l'anavaccin une fois donnèrent des résultats négatifs. De même, les 2 lapins immunisés par le vaccin.

Le nombre restreint des animaux en expérience ne permet pas de tirer de conclusions sur l'effet immunisant de l'anavaccin comparativement à celui du vaccin; néanmoins, il semble qu'après l'immunisation par l'anavaccin, une grande partie des lapins ne deviennent pas porteurs de bacilles (après inoculation ultérieure). La dose infectante était très élevée, et dans les expériences de Maltaner, tous les lapins survivants devenaient porteurs de germes.

DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS.

Les expériences décrites ci-dessus montrent que les lapins immunisés par l'anavaccin forment en quantité considérable des anticorps contre les bacilles typhiques, ce qu'on réussit à démontrer par différentes réactions sérologiques. Il est surtout à remarquer que le taux des agglutinines somatiques qui ont probablement la plus grande signification dans l'état de l'immunité ne diffère pas chez les lapins immunisés par l'anavaccin et chez les lapins immunisés par le vaccin antityphique.

De même, la précipitation des polysaccharides spécifiques du bacille d'Eberth est égale pour les deux modes de vaccination. L'action bactériolytique est aussi suffisamment prononcée. Les expériences sur la sensibilisation par la méthode de Kahn prouvent que l'anavaccin constitue un moyen de sensibilisation non moins efficace que le vaccin.

Les essais de rendre les lapins « porteurs de germes », témoignent de l'effet positif de l'anavaccin.

De cette façon, les résultats de nos différentes épreuves prouvent que l'anavaccin présente des propriétés antigènes considérables.

L'anavaccin antityphique donnant des réactions beaucoup plus faibles peut être par conséquent introduit à une dose plus élevée que le vaccin ordinaire. L'anavaccin offre une grande valeur pratique qui augmente encore par le fait qu'en employant de fortes doses on pourrait probablement ne faire que deux injections au lieu de trois.

CONCLUSIONS.

1° La réaction d'agglutination (avec évaluation des agglutinines H et O), la réaction de fixation du complément, l'épreuve bactériolytique *in vitro* et la réaction de précipitation du polysaccharide spécifique, prouvent que l'immunisation des lapins par l'anavaccin antityphique stimule une production abondante d'anticorps spécifiques;

2° L'anavaccin, introduit dans la peau, provoque une allergie locale des tissus à l'anavaccin et au vaccin injectés ultérieurement;

3° Dans nombre de cas, les lapins immunisés par l'anavaccin ne deviennent pas porteurs de germes, si on leur inocule des cultures vivantes par voie veineuse;

4° Il serait désirable d'étudier les effets de l'anavaccin dans la lutte contre les épidémies.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ARKWRIGHT, Cit. p. TOPLEY. *Lancet*, 1929, p. 1337.
- [2] BASILEWSKI. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch.*, 80, 1933, p. 479.
- [3] BELJAVCEV, Zenzinova Nesn. *Journ. Microbiolog. et Epidémiol.*, n° 9 et 10, 1932; n° 1, 1934.
- [4] BIEN. *Zentralbl. f. Bakt. O.*, 93, 1924, p. 196.
- [5] BOUDAKOV, ROMANENKO et TOKAREVITCH. *Microbiol. Journ.*, 13, n° 1, 1931.
- [6] FILIPPOVA, KOURDUKOVA et SEMICHEVA. *Journ. Microbiol. et Epidémiol.*, n° 5, 1934, p. 100.
- [7] GAY et CLAYPOLE. *Arch. Intern. Méd.*, 12, 1913, p. 621.
- [8] KAHN. *The Journ. of Immunol.*, 25, 1933, p. 295.
- [9] KOSMODEMIANSKI et FAIBITSCH. *Journ. Microbiol. et Epidémiol.*, n° 9 et 10, 1932; n° 3 et 4, 1933.
- [10] KOUPELSTEIN, PRODAN, KOTLJAREVSKI et CHOCHAL. *Journ. Microbiol. et Epidémiol.*, n° 5, 1934, p. 121.
- [11] MALTANER. *The Journ. of Immunol.*, 26, 1934, p. 161.
- [12] NOSOV. *Journ. Microbiol. et Epidémiol.*, n° 1, 1934, p. 43.
- [13] PALAVANDOV, KOUPELSTEIN, PRODAN et KOTLJAREVSKI. *Journ. Microbiol. et Epidémiol.*, n° 5, 1934, p. 114.
- [14] PATANÉ. *Bolletino*, 3, fasc. 40, 1931.
- [15] TIMAKOV. *Journ. Microbiol. et Epidémiol.*, n° 5, 1934, p. 106.
- [16] TOPLEY et AYRTON. *Journ. Hyg.*, 23, 1924, p. 198.
- [17] WHITE. *Med. Res. Coun. Spec. Rep. Ser.*, n° 103, 1926.
- [18] WICHELENZKI, BITCHKOV et DOBOURENKO. *Sovetskaja Veterinarija*, n° 19 et 20, 1932.
- [19] ZDRODOVSKI. *Journ. Microbiol. et Epidémiol.*, n° 9 et 10, 1932, p. 1.

ÉTUDE *IN VIVO* ET *IN VITRO*
SUR LE SORT DE LA TOXINE TÉTANIQUE
DANS LE TUBE DIGESTIF

par ROBERT REGAMEY.

(*Institut d'Hygiène de l'Université de Zurich.*)

Depuis cinquante ans, de nombreux auteurs ont cherché à expliquer l'innocuité de certaines toxines bactériennes administrées par voie entérale : introduites *per os* ou *per rectum*, des doses énormes de toxine tétanique ou diphtérique sont fort bien supportées par l'animal d'expérience.

Ransom croyait que la toxine était éliminée avec les fèces, sans avoir subi de transformation au cours de son passage dans le tractus digestif. Gibier suppose que la toxine est retenue, détruite peut-être, par la muqueuse intestinale, ou encore qu'elle est absorbée, puis transportée dans le foie qui la détruit. Charrin, Lefèvre, Metchnikoff pensent que la toxine tétanique est modifiée par les sécrétions gastriques et la flore saprophytique du tube digestif. Nencki, Sieber, Schoumow-Simanowski, Carrière mettent en évidence l'action des sucs digestifs sur la toxine et II. Vincent conclut de ses recherches que : « la toxine tétanique est susceptible de perdre son activité dans l'une quelconque des régions de la portion sous-diaphragmatique du tube digestif. Prise individuellement, chacune des sécrétions de l'estomac, du foie, de l'intestin et du pancréas annihile en trente minutes et même moins, des proportions énormes de toxine » (1).

Par des expériences *in vivo*, nous nous sommes proposé de déterminer, dans chacun des éléments sous-diaphragmatiques

(1) D'après Lemétayer, l'administration prolongée d'anatoxine tétanique par voie buccale à des cobayes et des lapins ne procure aucune immunité. Par contre, on peut immuniser ces animaux en leur administrant de petites doses d'anatoxine tétanique par voie rectale; l'immunité ainsi obtenue est beaucoup moins élevée que celle produite par l'injection sous-cutanée du même antigène.

du tube digestif, le temps nécessaire à la disparition de la toxine tétanique ingérée, puis de rechercher *in vitro* l'influence que pourraient avoir sur cette toxine le contenu de l'estomac, de l'intestin grêle, du gros intestin et la bile.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé deux différentes toxines tétaniques. La première fut préparée par nous selon la méthode préconisée par Ramon et Legroux (cf. *C. R. Soc. Biol.*, 113, 1933, p. 861), à partir d'une souche isolée à la clinique chirurgicale de l'Université de Zurich. La seconde provenait de l'Institut sérothérapique et vaccinal suisse à Berne. Ces deux toxines étaient de valeur sensiblement identique, tuant la souris de 15 grammes en quatre à cinq jours à la dose de 1/100.000 de centimètre cube, en deux à trois jours à la dose de 1/50.000, et le cobaye de 300 grammes en deux à trois jours à la dose de 1/15.000 de centimètre cube.

PREMIÈRE PARTIE

Expériences *in vivo*.

TECHNIQUE. — Tous les cobayés utilisés ont un poids variant de 275 à 325 grammes.

Le cobaye est laissé à jeun pendant dix-huit ou vingt-quatre heures. Il reçoit par une sonde urétrale de caoutchouc bien huilée et introduite avec précaution jusque dans l'estomac 1 à 5 cent. cubes de toxine tétanique. Quinze, trente, quarante-cinq, soixante ou quatre-vingt-dix minutes après l'ingestion, l'animal est sacrifié. La portion sous-diaphragmatique du tube digestif est aussitôt prélevée et divisée en quatre parts :

a) *Estomac*. — Le contenu gastrique, filtré sur papier, donne un liquide très fluide, trouble, vert jaunâtre, à réaction fortement acide. Le liquide est alcalinisé avec du carbonate de soude en solution concentrée, puis injecté à la souris sous la peau du dos, à la dose de 1 à 1 c.c. 5.

b) *Première portion du grêle* (grêle I). — Le contenu des 30 premiers centimètres de l'intestin, comprenant le duodénum et le début du grêle, est exprimé au moyen de pincettes à extrémités plates. Le matériel récolté est en général peu abondant, assez muqueux, jaunâtre, de réaction alcaline : il est en totalité injecté à la souris.

c) *Seconde portion du grêle* (grêle II). — Même procédé que ci-dessus avec le reste du grêle. Le liquide obtenu est plus abondant, un peu plus fluide, vert sale ; il contient beaucoup de mucus et sa réaction est alcaline. La souris en reçoit 1 cent. cube.

d) *Gros intestin*. — Les matières recueillies dans le cæcum et le côlon sont diluées dans leur équivalent volumétrique de bouillon. Le tube qui les renferme est énergiquement agité pendant cinq minutes, puis centrifugé pen-

dant une heure; le liquide décanté est dilué encore une fois avec un volume égal de bouillon, filtré sur terre d'infusoires, puis sur bougie Silberschmidt. 1 cent. cube du filtrat, qui est vert noirâtre, un peu filant, de réaction alcaline, est injecté à la souris.

L'estomac, le duodénum et le grêle ne contiennent que très peu de bactéries; celles-ci ne sont pas pathogènes pour la souris. Par contre, le côlon est si riche en micro-organismes qu'il nécessite une filtration parfaite de son contenu : chaque fois que nous avons négligé cette opération, les animaux injectés mouraient en moins de vingt-quatre heures.

Nous avons tenu à vérifier l'innocuité de la toxine tétanique introduite *per os*, 13 cobayes, à jeun depuis la veille, ingérèrent de 1 à 5 cent. cubes de toxine; aucun ne présenta par la suite le moindre symptôme de tétanos; l'un d'entre eux mourut au neuvième jour d'une affection intercurrente.

TABLEAU I. — Cobayes tués
quinze minutes après l'ingestion de la toxine (1).

SOURIS INJECTÉE
.. minutes après
la mort du cobaye

ÉVOLUTION CHEZ LA SOURIS

Cobaye 1988. Ingestion de 1 cent. cube :

Estomac	15	Te < 36 h.	+ Te 48 h.
Grêle I	25	Te < 36 h.	+ Te 55 h.
Grêle II.	20		Survie.
Côlon.	1:0		Survie.

Cobaye 4054. Ingestion de 1 cent. cube :

Estomac	40	Te 41 h.	+ Te 62 h.
Grêle I	30	Te 41 h.	+ Te 70 h.
Grêle II.	40		Survie.
Côlon.	285		Survie.

Cobaye 4591. Ingestion de 1 cent. cube.

Estomac	40	Te 40 h.	+ Te 50 h.
Grêle I	30	Te 44 h.	+ Te 64 h.
Grêle II.	45		Survie.
Côlon.	265		Survie.

Cobaye 4883. Ingestion de 3 cent. cubes :

Estomac	25	Te 21 h.	+ Te 40 h.
Grêle I	40	Te 47 h.	+ Te 120 h.
Grêle II.	45	Te 45 h.	+ Te 90 h.
Côlon.	345		Survie.

Après quinze minutes, la toxine est encore présente dans l'estomac; elle a déjà passé dans la première et parfois même dans la seconde partie du grêle. Dans le côlon, nous ne retrouvons pas trace de toxine.

(1) Te = symptômes caractéristiques de tétanos; + Te = mort par tétanos; + = aff. int., mort par affection intercurrente indéterminée.

TABLEAU II. — Cobayes tués trente minutes après l'ingestion de la toxine.

SOURIS INJECTÉE
... minutes après
la mort du cobaye

ÉVOLUTION CHEZ LA SOURIS

Cobaye 896. Ingestion de 1 cent. cube :

Estomac	55	Te 40 h.	+ Te 72 h.
Grêle I.	30	Te 60 h.	Survie.
Grêle II	60		+ aff. int.
Côlon	65		+ aff. int.

Cobaye 926. Ingestion de 1 cent. cube :

Estomac	45	Te 30 h.	+ Te 52 h.
Grêle I.	25	Te < 24 h.	+ Te 29 h.
Grêle II	25	Te < 24 h.	+ Te 52 h.
Côlon	85		+ aff. int.

Cobaye 1130. Ingestion de 1 cent. cube :

Estomac	5	Te 44 h.	+ Te 96 h.
Grêle I.	10	Te 72 h.	+ Te 80 h.
Grêle II	45		+ aff. int.
Côlon	165		Survie.

Cobaye 4590. Ingestion de 1 cent. cube :

Estomac	35	Te 46 h.	+ Te 90 h.
Grêle I.	35	Te 39 h.	+ Te 68 h.
Grêle II	45	Te 44 h.	+ Te 52 h.
Côlon	275		Survie.

Cobaye 4835. Ingestion de 3 cent. cubes.

Estomac	30	Te 48 h.	+ Te 92 h.
Grêle I.	35	Te 22 h.	+ Te 49 h.
Grêle II	40	Te 22 h.	+ Te 54 h.
Côlon	330		Survie.

Après trente minutes, la toxine est régulièrement décelable dans l'estomac et dans le grêle, en général dans les deux portions de celui-ci; elle n'est pas décelable dans le côlon.

TABLEAU III. — Cobayes tués quarante-cinq minutes après l'ingestion de la toxine.

SOURIS INJECTÉE ... minutes après la mort du cobaye		ÉVOLUTION CHEZ LA SOURIS	
—			
<i>Cobaye 1636.</i> Ingestion de 2 cent. cubes.			
Estomac.	15	Te 64 h.	Survie.
Grêle I.	20	Te < 36 h.	+ Te 56 h.
Grêle II	30		Survie.
Côlon	150		Survie.

Cobaye 1730. Ingestion de 1 cent. cube :

Estomac	50		Survie.
Grêle I.	65	Te 41 h.	+ Te 54 h.
Grêle II	75	Te 47 h.	+ Te 68 h.
Côlon	313		Survie.

Cobaye 1840. Ingestion de 2 cent. cubes.

Estomac	20		Survie.
Grêle I.	25		Survie.
Grêle II	45		Survie.
Côlon	375		Survie.

Cobaye 4925. Ingestion de 3 cent. cubes :

Estomac	25		Survie.
Grêle I.	40	+ aff. int.	
Grêle II	50	Te 54 h.	+ Te 75 h.
Côlon	320		Survie.

Après quarante-cinq minutes, nous ne retrouvons en général plus de toxine dans l'estomac ; cependant, chez le cobaye 1656, il s'y trouve encore une quantité de toxine suffisante pour déclencher des symptômes de tétanos, mais non pour provoquer la mort. La toxine est décelable dans le grêle, soit dans la première, soit dans la seconde partie de cet organe, soit encore dans ces deux éléments à la fois. Nous ne retrouvons jamais de toxine dans le côlon.

Chez le cobaye 1840, après quarante-cinq minutes, nous n'avons pu nulle part mettre la toxine en évidence.

TABLEAU IV. — Cobayes tués
soixante minutes après l'ingestion de la toxine.

	SOURIS INJECTÉE minutes après la mort du cobaye	ÉVOLUTION CHEZ LA SOURIS
<i>Cobaye 832. Ingestion de 1 cent. cube :</i>		
Estomac	20	Survie.
Grêle I.	45	Survie.
Grêle II	65	Survie.
Côlon	—	—
<i>Cobaye 1010. Ingestion de 1 cent. cube :</i>		
Estomac	25	Survie.
Grêle I.	20	Survie.
Grêle II	30	Survie.
Côlon	120	Survie.
<i>Cobaye 1065. Ingestion de 1 cent. cube :</i>		
Estomac	20	Survie.
Grêle I	35	Survie.
Grêle II	25	+ aff. int.
Côlon	105	+ aff. int.

Cobaye 1090. Ingestion de 1 cent. cube (animal non à jeun) :

Estomac	25	Survie.
Grêle I.	30	Survie.
Grêle II	20	Survie.
Côlon	85	Survie.

Cobaye 1541. Ingestion de 5 cent. cube :

Estomac	25	Survie.
Grêle I.	15	Survie.
Grêle II	10	+ aff. int.
Côlon	355	Survie.

Cobaye 4756. Ingestion de 3 cent. cubes :

Estomac	35	Survie.
Grêle I.	25	Survie.
Grêle II	30	Survie.
Côlon	195	Survie.

Après soixante minutes, nulle part dans le tractus digestif, nous ne pouvons décèler de toxine tétanique.

TABLEAU V. — Cobayes tués
quatre-vingt-dix minutes après l'ingestion de la toxine.

	SOURIS INJECTÉ ... minutes après la mort du cobaye	ÉVOLUTION CHEZ LA SOURIS
<i>Cobaye 1454.</i> Ingestion de 2 cent. cubes :		
Estomac	20	+ 120 h. aff. int.
Grêle I.	30	+ 120 h. aff. int.
Grêle II.	35	+ 36 h. aff. int.
Côlon.	115	Survie.
<i>Cobaye 1542.</i> Ingestion de 5 cent. cubes :		
Estomac	30	Survie.
Grêle I.	20	Survie.
Grêle II.	25	Survie.
Côlon.	300	Survie.

Après quatre-vingt dix minutes, nous ne retrouvons plus de toxine dans le tube digestif.

Reprenons cette première série d'expériences :

Dans l'*estomac*, la toxine ingérée disparaît au bout de quarante-cinq minutes.

Dans le *duodénum*, le *jéjunum* et l'*iléon* — qu'il s'agisse de ce que nous avons convenu d'appeler première ou seconde partie du grêle — nous trouvons de la toxine tétanique déjà

après quinze minutes. Après quarante-cinq minutes, nous pouvons encore déceler la toxine dans la totalité du grêle ou dans un seul de ses segments, mais en moins d'une heure, cette toxine disparaît de l'intestin grêle (1).

Dans le *côlon*, et plus particulièrement dans le *cæcum*, nous n'avons jamais pu mettre en évidence la toxine tétanique, soit parce que la toxine est neutralisée ou détruite dans sa totalité en amont de la valvule de Bauhin, soit parce que, à peine entrée dans le *cæcum*, elle y est détruite, soit encore parce que notre méthode d'investigation est trop imparfaite : on pourrait nous objecter que pendant le temps nécessaire à la filtration des matières fécales du gros intestin, la toxine, présente dans les fèces au début de l'opération, ne se retrouve plus dans le filtrat, détruite par la flore microbienne ou les sucs digestifs. Nous reviendrons sur ce point dans la suite.

En résumé, nous pouvons conclure que *la toxine tétanique, quelle qu'en soit la dose ingérée, disparaît en moins de quarante-cinq minutes de l'estomac et en moins d'une heure de l'intestin grêle; elle n'est pas décelable dans le côlon.*

DEUXIÈME PARTIE

Expériences *in vitro*.

Le matériel utilisé fut prélevé, sitôt après leur mort, chez des cobayes fournisseurs du complément nécessaire à la réaction de Bordet-Wassermann.

(1) Il est intéressant de noter la rapidité du passage dans le tube digestif d'éléments liquides comme la toxine tétanique ou une suspension de charbon. Si nous faisons ingérer au cobaye à jeun 3 cent. cubes d'un bouillon riche en suspension de charbon en poudre « Merck », et que nous le recherchions dans l'intestin, nous constatons qu'après quinze minutes le charbon a parcouru le duodénum, le jéjunum et qu'il a déjà gagné la dernière portion du grêle (cf. cobaye 4883); après trente minutes, tout le grêle, du pylore à la valvule de Bauhin, contient du charbon; après quarante-cinq minutes et plus, la suspension de charbon est accumulée dans la portion terminale du grêle, tandis que le côlon ne semble contenir que des traces de la suspension ingérée. Nous ne saurions pousser plus loin la comparaison entre la toxine tétanique et notre suspension de charbon, puisque cette dernière est encore visible plusieurs heures dans le grêle, alors qu'au bout de soixante minutes, la toxine tétanique n'est plus décelable.

A. — CONTENU GASTRIQUE.

Nous avons étudié l'action :

1° Du contenu gastrique total ;

2° Du liquide filtré sur papier ;

3° Du filtrat recueilli après passage sur bougie du liquide gastrique ; ce filtrat est dépourvu de matières alimentaires et de bactéries ;

4° Du même filtrat, mais neutralisé.

1. *Action du contenu gastrique total.* — Dans 3 tubes, nous mélangeons 8 cent. cubes de contenu gastrique brut et 2 cent. cubes de toxine tétanique. Après une demi, six et vingt-quatre heures pendant lesquelles les tubes sont gardés à la température de la chambre, le mélange est filtré sur papier, puis neutralisé avec une solution concentrée de carbonate de soude. La souris reçoit par voie sous-cutanée des doses calculées de toxine, après dilution préalable avec du bouillon.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du contenu total de l'estomac sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000 . .	Survie.	Survie.	—
1 : 10.000 . .	Survie.	Survie.	Survie.
1 : 1.000 . .	Te 72 h. survie.	Survie.	Survie.
1 : 100 . .	+ Te 48 h.	Survie.	Survie.
1 : 10 . .	+ Te 31 h.	+ Te 120 h.	+ 96 h. aff. int.

Après trente minutes déjà, l'activité de la toxine tétanique est fortement affaiblie ; après six heures, elle est encore beaucoup plus atténuée pour être, semble-t-il, totalement neutralisée après vingt-quatre heures.

2. *Action du liquide gastrique.* — Le contenu gastrique est filtré sur papier. 2 tubes reçoivent chacun 8 cent. cubes du filtrat et 2 cent. cubes de toxine tétanique. L'un des tubes est mis à l'étuve à 37°, l'autre est gardé à la température de la chambre.

Tube mis à l'étuve à 37°.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du liquide gastrique sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000 . .	+ Te 105 h.	Te 60 h. survie.	Survie.
1 : 10.000 . .	+ Te 52 h.	+ Te 48 h.	Te 72 h. survie.
1 : 1.000 . .	»	+ Te < 36 h.	+ Te < 36 h.

Tube gardé à la température de la chambre.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du liquide gastrique sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000. . .	Te 50 h. survie.	+ Te 138 h.	+ Te 122 h.
1 : 10.000. . .	+ Te 56 h.	+ Te 66 h.	+ Te 60 h.
1 : 1.000. . .	—	+ Te < 36 h.	+ Te < 36 h.

Le mélange mis à l'étuve ne présente une atténuation notable de la toxine qu'après vingt-quatre heures, tandis que celui gardé à la température de la chambre, ne permettant qu'un moindre développement de la flore bactérienne, n'offre aucun changement appréciable de l'activité de la toxine.

3. *Action du filtrat sur bougie.* — Le contenu gastrique est filtré sur papier, puis sur bougie Silberschmidt. 8 cent. cubes de liquide, dont le pH est 2,7, sont additionnés de 2 cent. cubes de toxine tétanique. Le tout est mis à l'étuve à 37°.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du filtrat sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000	+ Te 118 h.	+ Te 92 h.	+ Te 54 h.
1 : 10.000	+ Te 50 h.	+ Te 48 h.	+ Te 3½ h.
1 : 1.000	—	+ Te < 36 h.	+ Te < 36 h.

Le filtrat sur bougie du contenu gastrique n'a pas d'influence notable sur l'activité de la toxine tétanique.

4. *Action du filtrat sur bougie neutralisé.* — Le contenu gastrique est filtré sur papier, puis neutralisé avec du carbonate de soude en solution concentrée et passé sur bougie Silberschmidt. Le mélange de 8 cent. cubes de ce liquide et de 2 cent. cubes de toxine tétanique est mis à l'étuve à 37°.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du filtrat neutralisé sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000. . .	Te 54 h. survie.	+ Te 72 h.	+ Te 69 h.
1 : 10.000. . .	+ Te 44 h.	+ Te 60 h.	+ Te 44 h.
1 : 1.000. . .	—	+ Te < 36 h.	+ Te < 36 h.

Le filtrat sur bougie, neutralisé, n'a aucune action sur la toxine tétanique.

Le contenu gastrique total, même après un temps très bref, diminue considérablement l'activité de la toxine tétanique ;

privé de ses constituants alimentaires, il perd rapidement ses propriétés atténuantes. La flore microbienne ne joue qu'un très faible rôle dans l'atténuation de la toxine. Que le milieu soit très acide ou neutre, les ferments digestifs contenus dans le filtrat sur bougie n'affaiblissent pas la toxine.

B. — CONTENU DE L'INTESTIN GRÊLE.

Le contenu du grêle proprement dit, auquel est additionné celui du duodénum, se présente sous la forme d'une masse plus ou moins liquide, visqueuse, assez pauvre en matières alimentaires, et dont le pH voisin de 8,0-8,2 n'a pas d'influence sur la toxine tétanique. Nous étudierons l'action :

1° Du contenu de l'intestin grêle *in toto* ;

2° Du liquide privé de matières alimentaires et de bactéries obtenu par passage sur filtre Seitz.

1. *Action du contenu du grêle « in toto »*. — 8 cent. cubes de contenu brut du grêle sont additionnés de 2 cent. cubes de toxine tétanique; le mélange est mis à l'étuve à 37°, puis injecté à la souris après dilutions convenables dans du bouillon.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du contenu total du grêle sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000	Survie.	Survie.	Survie.
1 : 25.000	+ Te 212 h.	Survie.	Survie.
1 : 10.000	+ Te 43 h.	+ Te 230 h.	Survie.
1 : 1.000	+ Te 28 h.	+ Te < 36 h.	+ Te 110 h.

L'atténuation de la toxine est déjà sensible après trente minutes; elle devient, progressivement, assez considérable après vingt-quatre heures.

2. *Action du filtrat sur bougie*. — Le contenu du grêle est filtré sur papier, centrifugé pendant une heure, puis passé sur filtre Seitz. 8 cent. cubes du filtrat, qui est légèrement muqueux, sont additionnés à 2 cent. cubes de toxine tétanique et mis à l'étuve.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du filtrat sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000	Survie.	Survie.	Survie.
1 : 25.000	+ Te 100 h.	+ Te 110 h.	Survie.
1 : 10.000	+ Te 55 h.	+ Te 190 h.	Survie.
1 : 1.000	—	+ Te 65 h.	+ Te 96 h.

L'atténuation de la toxine est notable après trente minutes ou six heures, plus nette encore après vingt-quatre heures.

Le contenu brut de l'intestin grêle a sur la toxine tétanique la même activité que son filtrat : la présence de matières alimentaires et de bactéries (1) n'augmente pas ses propriétés atténuantes.

C. — CONTENU DU GROS INTESTIN.

Nous rechercherons ici l'action :

1° Du contenu total du gros intestin ;

2° De son filtrat sur bougie Silberschmidt.

1. *Action du contenu total du gros intestin.* — 3 tubes renfermant chacun 2 cent. cubes de toxine tétanique et 8 cent. cubes de matières fécales récoltées dans le cæcum et la première portion du côlon sont mis à l'étuve à 37°, et retirés, l'un au bout de trente minutes, les autres après six et vingt-quatre heures. Le contenu du tube est additionné de 10 cent. cubes de bouillon, filtré sur papier, puis centrifugé pendant une heure. Le liquide décanté est filtré sur bougie Silberschmidt.

DOSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du contenu total du gros intestin sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures
<i>Evolution chez la souris :</i>			
1 : 50.000 . .	Survie.	Survie.	Survie.
1 : 10.000 . .	Te 72 h. survie.	Te ? 144 h. survie.	Survie.
1 : 1.000 . .	+ Te 49 h.	+ Te 54 h.	Survie.
1 : 100 . .	+ Te 30 h.	+ Te 24 h.	+ Te 37 h.

Le contenu intégral du cæcum et du côlon diminue notablement l'activité de la toxine après trente minutes ou six heures de contact; après vingt-quatre heures, la toxine est très fortement atténuée.

2. *Action du filtrat.* — Le contenu du cæcum et de la première partie du côlon est filtré sur papier, puis sur terre d'infusoires, centrifugé pendant une heure et passé finalement sur bougie Chamberland. 8 cent. cubes de filtrat sont additionnés à 2 cent. cubes de toxine tétanique et mis à l'étuve.

(1) Dans sa thèse de Zurich, Baumatz, étudiant la flore microbienne du duodénum et de l'intestin grêle, conclut à la grande pauvreté en bactéries de cette portion du tube digestif, et nous savons par ailleurs que beaucoup de bactéries saprophytes du tractus intestinal n'ont pas d'influence sur la toxine tétanique.

POSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION du filtrat sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures

Evolution chez la souris :

1 : 50.000	+ Te 76 h.	+ Te 80 h.	+ Te 100 h.
1 : 25.000	+ Te 55 h.	+ Te 54 h.	+ Te < 36 h.

Le filtrat n'a aucune action sur la toxine tétanique.

Le contenu du cæcum et du côlon atténue d'une façon très nette la toxine tétanique, même après trente minutes, tandis que le filtrat, dépourvu de fèces et de bactéries, ne joue aucun rôle.

D. — ACTION DE LA BILE.

Depuis les travaux de H. Vincent — qui les a découvertes — de Sédallian et Velluz, de Jucker, nous savons que les cryptotoxines sont des toxines qui ont perdu leur activité sous l'influence de la bile, tout en gardant certaines propriétés antigéniques. Dans quelle mesure la disparition de la toxine ingérée est-elle due à l'action de la bile?

A 8 cent. cubes de bile recueillie aseptiquement par ponction de la vésicule chez des cobayes récemment tués, nous ajoutons 2 cent. cubes de toxine tétanique. Le mélange est mis à l'étuve, puis injecté à la souris après dilution dans du bouillon.

POSES injectées en cent. cube	DURÉE DE L'ACTION de la bile sur la toxine		
	30 minutes	6 heures	24 heures

Evolution chez la souris :

1 : 50.000	Survie.	Survie.	Survie.
1 : 25.000	+ Te 135 h.	Survie.	Survie.
1 : 10.000	+ Te 155 h.	Survie.	Survie.
1 : 1.000	+ Te 60 h.	+ Te 124 h.	Survie.
1 : 100	—	+ Te 80 h.	Survie.
1 : 10	—	—	+ Te < 36 h.

La bile n'agit sur la toxine qu'après un certain temps de contact. Au début de ses recherches sur les cryptotoxines (cf. *C. R. Soc. Biol.*, 63, 1907, p. 634), H. Vincent avait déjà remarqué que l'action de la bile ne se manifestait de façon appréciable qu'après une heure.

Reprenons les résultats acquis au cours de nos expériences *in vitro*.

Le contenu gastrique *in toto* atténue très fortement la toxine tétanique, même après un temps de contact relativement court. Si, par une simple filtration sur papier, nous le privons des matières alimentaires, il perd aussitôt une grande part de son activité; et si, par filtration sur bougie, nous éliminons la flore bactérienne, nous sommes en présence d'un liquide n'ayant aucune activité sur la toxine. Nous croyons devoir prêter à l'*adsorption* par les matières alimentaires un rôle très important dans l'atténuation de la toxine.

L'intestin grêle, pauvre en matières alimentaires et en bactéries, diminue de façon sensible l'activité de la toxine tétanique; cette action est aussi grande avec le filtrat qu'avec le contenu total : l'*adsorption* et les bactéries ne jouent aucun rôle.

Le gros intestin a sur la toxine tétanique autant d'action que le grêle, mais son contenu n'agit que grâce à la présence des matières fécales et des bactéries; le filtrat n'a aucune activité.

La bile jouit d'un pouvoir antitoxique net après un temps de contact assez prolongé avec la toxine. Elle ne saurait intervenir que dans une très faible mesure dans la disparition de la toxine ingérée.

Conclusions.

Nos expériences *in vivo* démontrent que :

1° *Le cobaye peut absorber per os des doses énormes de toxine tétanique sans présenter le moindre symptôme de tétanos;*

2° *La toxine ingérée disparaît de l'estomac en moins de quarante-cinq minutes, de l'intestin grêle en moins d'une heure;*

3° *La toxine ne fut jamais décelée dans le gros intestin, probablement détruite ou neutralisée pendant le temps nécessaire à la filtration des matières fécales.*

Nos expériences *in vitro* nous permettent de penser que :

1° *Le contenu gastrique atténue considérablement l'activité de la toxine tétanique; cette action est due principalement à l'adsorption par les matières alimentaires, la flore microbienne ne jouant qu'un faible rôle, les ferments et l'acidité du suc gastrique n'en jouant aucun;*

2° Le contenu de l'intestin grêle, privé ou non de matières alimentaires et des bactéries, atténue sensiblement la toxine ;

3° Le gros intestin est capable d'atténuer de façon notable la toxine, grâce à l'adsorption et à la flore microbienne ;

4° La bile n'intervient que dans une faible mesure dans la disparition de la toxine du tube digestif ; son activité antitoxique n'est décelable qu'après un contact prolongé.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUMATZ (S). *Thèse Zurich*, 1925.
 BRETON (M.) et PETIT (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **64**, 1908, p. 813.
 CARRIÈRE (G.). *Ces Annales*, **13**, 1899, p. 435.
 CHARRIN (A.). *Arch. de Physiol.*, 1896, p. 597.
 CHARRIN (A.) et LEFÈVRE (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **49**, 1897, p. 830.
 CLINTOCK (T. Mc.) et KING (W. E.). *Journ. of Inf. dis.*, **3**, p. 701.; *Id.*, **6**, p. 46.
 DIETRICH (W.). *Klin. Woch.*, **1**, 1922, p. 1160.
 DUMAS (J.) COMBIESCO (D.), BALTEANO (J.). *C. R. Acad. Sciences*, **175**, 1922, p. 793.
 GIBIER, cité par Carrière. *Loc. cit.*
 GRASSET (E.). *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 1926, p. 1407.
 GUTSCHER (H.). *Thèse Zurich*, 1932.
 HAMBURGER (F.) et MONTI (R.). *Münch. med. Woch.*, 1908, p. 1640.
 JUCKER (E.). *Thèse Zurich*, 1931.
 KELLENBERGER (K.). *Zeitschr. f. Hyg.* **106**, 1926, p. 253.
 LARSON, HANCOCK, HOWARD. *Proc. Soc. for. exp.*, **22**, p. 552.
 LEMÉTAYER (T.). *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1933, p. 53.
 MARIE (A.). *Ces Annales*, **11**, 1897, p. 591.
 MAYERHOFER (E.) et PRIRAM (E.). *Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther.*, t. 7, p. 247.
 NEILL (J. M.). *Journ. of Immun.*, **22**, p. 117.
 NENCKI, SIEBER, SCHOUROW-SIMANOWSKI. *Zentrabl. f. Bakt.*, **23**, 1898, p. 840 et 880.
 NINNI (C.). *Ann. d'Igiene*, **31**, p. 121.
 PANISSET (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **70**, 1911, p. 681.
 RANSOM. *Deutsche Med. Woch.*, 1898, p. 117.
 RAMON (G.) et GRASSET (E). *Ces Annales*, **41**, 1927, p. 868; *Id. C. R. Biol.*, **95**, 1926, p. 1405.
 RAMON (G.) et ZOELLER. *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 1926, p. 1409; *Id.*, *Ces Annales*, **41**, 1927, p. 803.
 RAMON et LEGROUX. *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 1933, p. 861; *Id.*, **95**, 1934, p. 1183.
 SEDALLIAN (P.) et GAUMONT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **97**, 1927, p. 93.
 SEDALLIAN (P.) et VELLUZ (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **97**, 1927, p. 496.
 SCHUTZ (A.). *Zeitschr. f. Hyg.*, **61**, 1908, p. 115.
 TCHITCHKINE (A.). *Ces Annales*, **19**, 1905, p. 335.
 TIFPENEAU et MARIE (A.). *Ces Annales*, **22**, 1908, p. 644.
 VALLÉE (H.) et FINZI (G.). *C. R. Soc. Biol.*, **71**, 1911, p. 171.
 VINCENT (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **63**, 1907, p. 623 et 692; *Id.*, *Ces Annales*, **22**, 1908, p. 341.; *Id.*, *C. R. Soc. Biol.*, **67**, 1909, p. 695.; *Id.*, **95**, 1926, p. 1525; *Id.*, *C. R. Acad. Sciences*, **182**, 1926, p. 1037.
 WALLACE (UNA) *Journ. of pathol. and bact.*, **30**, 1927, p. 667.

ÉTUDES SUR LA FAUNE DES PROTOZOAIRES DE QUELQUES SOLS DU SAHARA ET DES HAUTS PLATEAUX ALGÉRIENS

par L. VARGA (Sopron).

Privatdozent de l'Université de Szeged (Hongrie).

(*Travail du Laboratoire de Biologie saharienne
de la Faculté des Sciences d'Alger, à Beni-Ounif, n° 4.*
Directeur : Charles KILLIAN.)

Donnant suite à l'initiative de M. le professeur Killian et de M. le professeur Féher (1), j'ai examiné la faune des Protozoaires de quelques sols du Sahara et des Hauts-Plateaux algériens, pour en fournir un relevé aussi complet que possible.

De ces échantillons de sols dont les caractères, physiques et chimiques, ont été examinés simultanément, j'ai pris 20 à 25 grammes et j'en ai fait une suspension; j'en ai isolé les Protozoaires d'après ma méthode, décrite antérieurement.

Dans ce qui suit, je donne la liste des espèces de Protozoaires cultivés à partir de différents échantillons de sols. Les espèces marquées par *x* n'ont, jusqu'ici, jamais été trouvées dans le sol.

A. — Sols du Sahara.

1. — SOL PRÈS DE BENI-OUNIF.

Sur la pente sud-ouest de la montagne, près des rochers : roche dégradée (sable) avec *Zizyphus lotus*. Teneur en eau : 6,2 p. 100, pH 6,95; conductivité électrique : $K_{18} = 15,46.10^{-5}$; teneur en humus : 0,4 p. 100.

(1) Ces Annales, 1935, t. 55, p. 573.

Rhizopoda :

<i>Acanthocystis aculeata</i> Hertwig-Les-ser.	<i>Amœba terricola</i> Ehrbg.
x <i>Acanthocystis longiseta</i> Pén.	<i>Bionyx vagans</i> Leidy.
<i>Amœba limax</i> Duj.	x <i>Cochliopodium granulatum</i> Pén.
x <i>Amœba Penardii</i> Schout.	<i>Hartmanella hyalina</i> (Dang) Alex.
<i>Amœba radiosa</i> Duj.	<i>Negleria Gruberi</i> Wilson.
	<i>Vahlkampfia tachypodia</i> Gruber.

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.
<i>Bodo celer</i> Klebs.	<i>Dimorpha mutans</i> Gruber.
<i>Bodo edax</i> Klebs.	<i>Mastigamœba limax</i> Moroff.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	x <i>Mastigella commutans</i> (H. Meyer) Goldschmidt.
x <i>Cercobodo bodo</i> (H. Meyer) Lemm.	x <i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch) H. Meyer.
<i>Cercobodo ovatus</i> (Klebs) Lemm.	<i>Monas guttula</i> Ehrbg.
x <i>Cercobodo radiatus</i> (Klebs) Lemm.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.	<i>Monas vulgaris</i> (Cienk) Senn.
<i>Oicomonas mutabilis</i> S. Kent.	
<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg) S. Kent.	

Ciliata :

<i>Chilodon cucullulus</i> Duj.	<i>Lacrymaria</i> sp.
<i>Colpidium colpoda</i> Stein.	<i>Oxytricha pellicionella</i> O. F. Müller.
<i>Colpoda cucullus</i> Ehrbg.	<i>Paramœcium putrinum</i> Clap-Lach.
<i>Colpoda Steinii</i> Maupas.	x <i>Plagiocampa mutabile</i> Schew.
<i>Glaucoma pyriformis</i> Ehrbg.	x <i>Urotricha lagenula</i> S. Kent.
<i>Glaucoma scintillans</i> Ehrbg.	<i>Vorticella microstoma</i> Ehrbg.

Le grand nombre (41) des espèces protozoaires est surprenant. Le nombre des espèces de *Ciliés* dépasse de beaucoup celui des sols de pays tempérés.

2. — SOL PRÈS DE BENI-OUNIF.

Grotte dans une palmeraie, 3 m. 1/2 sous la surface.

Prise de l'échantillon de sol : février 1933.

Teneur en eau : 6,4 p. 100, pH 6,90; conductivité électrique : $K_{18} = 90.6.10^{-5}$; teneur en humus : 1,04 p. 100.

Rhizopoda :

<i>Amœba guttula</i> Duj.	x <i>Sphenoderia lenta</i> Schlumbg.
<i>Amœba limax</i> Duj.	<i>Trinema enchelys</i> Ehrbg.
<i>Amœba radiosa</i> Ehrbg.	

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	x <i>Mastigella commutans</i> Goldschmidt.
<i>Bodo caudatus</i> Duj.	x <i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch.)
<i>Bodo celer</i> Klebs.	H. Meyer.
<i>Bodo saltans</i> Ehrbg.	<i>Monas guttula</i> Ehrbg.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.	<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg) S. Kent.
x <i>Colpomena loxodes</i> Stein.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.
x <i>Mastigamæba invertens</i> Klebs.	<i>Tetramitus spiralis</i> Goodey.
<i>Mastigamæba limax</i> Moroff.	

Ciliata :

<i>Colpoda cucullus</i> Ehrbg.	<i>Colpoda steinii</i> Maupas.
--------------------------------	--------------------------------

Dans ce terrain, le nombre minime de Rhizopodes et de Ciliés est surprenant.

3. — SOL PRÈS DE BENI-OUNIF.

Terrain argileux du désert avec *Anabasis*.

Prise de l'échantillon : février 1933.

Teneur en eau : 10 p. 100; teneur en humus : 0,41 p. 100,
pH 6,82; conductivité électrique : $K_{18} = 96,7.10^{-5}$.

Rhizopoda :

<i>Amœba albida</i> Nägler.	<i>Vahlkampfia lachypodia</i> Gruber.
x <i>Amœba dubia</i> Yollo.	x <i>Diffugia binucleata</i> Pén.
<i>Amœba limax</i> Duj.	x <i>Diffugia lithoplites</i> Pén.
x <i>Cochliopodium echinatum</i> Korot.	<i>Euglypha</i> sp.
x <i>Cochliopodium granulatum</i> Pén.	<i>Nægleria gruberi</i> Wilson.
<i>Pelomyxa palustris</i> Greeff.	<i>Parmulina oblecta</i> (Gruber) Pén.

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	x <i>Mastigella nitens</i> Pénard.
<i>Bodo celer</i> Klebs.	x <i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch.)
<i>Bodo edax</i> Klebs.	H. Meyer.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
x <i>Cercobodo bodo</i> (H. Meyer) Lemm.	<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg) S. Kent.
x <i>Cercobodo ovatus</i> (Klebs) Lemm.	x <i>Sterromonas formicina</i> S. Kent.
<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.
x <i>Mastigella commutans</i> (H. Meyer)	
Goldschmidt.	

Dans ce sol se trouvaient beaucoup de Rhizopodes (12 espèces) et Mastigophores (14 espèces), parmi eux des espèces

qui figurent très rarement dans le sol (*Mastigella nitens* Pen., *Sterromonas formicina* S. Kent!). Il est à remarquer que, de cet échantillon de sol, aucun Cilié n'a pu être isolé.

4. — SOL PRÈS DE BENI OUNIF.

Palmeraie arrosée, 4 kilomètres de Beni-Ounif, argile.

Prise d'échantillon : février 1933.

Teneur en eau : 7,4 p. 100; teneur en humus : 0,71 p. 100, pH 7,45, CaCO_3 : 32 p. 100; conductivité électrique : $\text{K}_{18} = 42.02.10^{-5}$.

Rhizopoda :

x *Amœba alveolata* Mereschk.
x *Amœba fluida* Gruber.
x *Amœba gorgonia* Pénard.
x *Amœba hylobates* Pénard.
Amœba limax Duj.
x *Amœba nitida* Pénard.

Amœba radiosa Duj.
Amœba terricola Ehrbg.
x *Amœba vitraea* Hertw-Less.
x *Cryptodiffugia sacculus* Pén.
Pelomyxa palustris Greeff.
Trinema complanatum Pén.

Mastigophora :

x *Bodo angustus* (Duj.) Bütschli.
Bodo caudatus Duj.
Bodo celer Klebs.
Bodo edax Klebs.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo vibrans Sandon.
Cercomonas crassicauda Alex.
Cercomonas longicauda Stein.
x *Lagenœca globulosa* Francé.
Mastigamœba limax Moroff.
x *Mastigamœba reptans* Stokes.

x *Mastigella commutans* Goldschm.
x *Mastigella radícula* (Moroff) Goldschm.
x *Monas amœbina* H. Meyer.
Monas arhabdomonas (Fisch) Meyer.
Monas guttula Ehrbg.
Monas vivipara Ehrbg.
Oicomonas termo (Ehrbg) S. Kent.
Phyllomitus undulans Stein.
x *Salpingœca pyxidium* S. Kent.
Tel. amitus rostratus Perty.

Ciliata :

Colpidium colpoda Stein.
Colpoda cucullus Ehrbg.
Colpoda Steinii Maupas.

Glaucoma scintillans Ehrbg.
Lacrymaria olor O. F. Müll.

Dans ce sol le grand nombre d'Amibes est frappant. J'ai pu isoler des espèces assez rares. Tout aussi remarquable est le grand nombre de Mastigophores avec des espèces très rares (p. ex. *Lagenœca*, *Salpingœca*, *Mastigamœba reptans* et principalement *Monas amœbina*).

5. — SOL PRÈS DE BENI-OUNIF.

Une dune locale, à l'intérieur d'une palmeraie avec des psaunnophytes.

Prise de l'échantillon du terrain : février 1933.

Teneur en eau : 6,5 p. 100, teneur en humus 0. 23 p. 100, Ca CO₃ : 31,4 p. 100, pH 6,36, conductivité électrique K_{18°} = 12,50. 10⁻⁵.

Rhizopoda :

<i>Amœba albida</i> Nägler.	x <i>Amœba nitida</i> Pén.
x <i>Amœba alveolata</i> Mereschk.	<i>Amœba radiosa</i> Duj.
x <i>Amœba ambulacralis</i> Pén.	<i>Amœba sphæronucleolus</i> Greff.
x <i>Amœba debilis</i> Jollos.	<i>Amœba terricola</i> Ehrbg.
<i>Amœba diploidea</i> Hartm-Nägl.	x <i>Amœba vitrea</i> Hertlew.-Less.
x <i>Amœba fluida</i> Gruber,	x <i>Cochliopodium granulatum</i> Pén.
x <i>Amœba gorgonia</i> Pén.	x <i>Euglypha compressa</i> Carter.
x <i>Amœba granulosa</i> Gruber.	<i>Euglypha laevis</i> (Ehrbg) Perty.
x <i>Amœba hylobates</i> Pén.	<i>Hartmannella hyalina</i> (Dang.) Alex.
x <i>Amœba lacustris</i> Nägler.	<i>Naegleria gruberi</i> Wilson.
<i>Amœba limax</i> Duj.	x <i>Pelomyxa paradoxa</i> Pén.

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	x <i>Mastigella nitens</i> Pén.
<i>Bodo caudatus</i> Duj.	x <i>Mastigella Penardii</i> Lemm.
<i>Bodo celer</i> Klebs.	x <i>Mastigella polyvacuolata</i> (Maroff).
<i>Bodo edax</i> Klebs.	Goldschm.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	x <i>Mastigella vitrea</i> Goldschm.
x <i>Cercobodos bodo</i> (H. Meyer) Lemm.	x <i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch) Mayer.
<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.	<i>Monas guttula</i> Ehrbg.
<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
x <i>Mastigamœba invertens</i> Klebs.	<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg) S. Kent.
x <i>Mastigella commutans</i> (Meyer) Goldschm.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.

Ciliata :

x <i>Chasmodostoma reniforme</i> Engelm.	<i>Glaucoma scintillans</i> Ehrbg.
<i>Colpidium colpoda</i> Stein.	<i>Prorodon tores</i> Ehrbg.
<i>Colpoda cucullus</i> Ehrbg.	x <i>Urotricha globosa</i> Schew.
x <i>Colpoda steinii</i> Maupas.	

Dans ce sol le grand nombre de Protozoaires (48 espèces) est très frappant. Parmi les Amibinés beaucoup d'espèces sont très rares et n'étaient connues que des eaux. Parmi les Masti-

gophores, de même, se trouvent des espèces très rares (voir les nombreuses espèces *Mastigella*, parmi elles *M. Penardii* et *M. polyvacuolata*). Même parmi les Ciliés se trouvent des espèces qui n'avaient pas encore été trouvées dans le sol. (*Chasmatostoma*, *Urotricha*).

6. — SURFACE D'ESSAI PRÈS DE BENI OUNIF I. PRINTEMPS.

Cette surface d'essai est située sur le bord de l'oasis de *Figuig*, 4 kilomètres à l'ouest de Beni-Ounif. Dune locale.

Palmeraie dont le sol n'est utilisé que pour la culture des palmiers. Végétation : *Telephium sphacrospermum*, *Helianthemum Lipii*, *Aristida obtusa*, *Anvillea radiata*, *Anabasis aetionoides*, *Ziziphus lotus*, *Salvia ægyptiaca*.

Prise d'échantillon : juin. Teneur en eau : 0.4 p. 100, pH 8,53, température de l'air : 40° C.

Rhizopoda :

Amœba froschi Nägler.

| *Vahlkampfia tachypodia* Gruber.

Mastigophora :

Bodolens (Müller) Klebs.

x *Cercobodo grandis* (Maskell) Lemm.

Cercobodo vibrans Sandon,

Cercomonas longicauda Stein.

| *Monas vivipara* Ehrbg.

x *Monas vulgaris* (Cienk) Senn.

Oicomonas mutabilis S. Kent.

| *Tetramitus rostratus* Perty.

La rareté des Protozoaires en été est frappante. Mais il est presque qu'incroyable que la vie animale ait pu être constatée dans un sol aussi sec. Les Ciliates y manquent complètement.

7. — SURFACE D'ESSAI II.

Située à 3 ou 5 kilomètres à l'ouest de Beni-Ounif à la limite de l'oasis de *Figuig*. Végétation : *Convolvulus supinus*, *Launea nudicaulis*, *Launea arborescens*. Sol : Reg.

a) Au printemps :

Prise de l'échantillon : avril. Teneur en eau 5,3 p. 100 pH 8,40, température du sol : 28° C.

Rhizopoda :

Amœba limax Duj.
Amœba radiosa Duj.

| *Amœba sphaeronucleolus* Greeff.

Mastigophora :

Bodo celer Klebs.
Bodo edax Klebs.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
 x *Cercobodo bodo* (H. Meyer) Lemm.

| *Cercobodo vibrans* Sandon.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Tetramitus rostratus Perty.

Au mois d'avril il y a donc très peu d'espèces dans le reg.
 Les Ciliés y manquent complètement.

b) En été :

Prise d'échantillon : juin. Teneur en eau 2,3 p. 100, pH 8,15.

Rhizopoda :

x *Amœba alveolata* Mereschk.
 x *Amœba lucens* Frenzel.

| *Nuclearia simplex* Cienk.

Mastigophora :

Bodo celer Klebs.
Bodo edax Klebs.
Bodo ovatus (Duj.) Stein.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo vibrans Sandon.

| *Monas vulgaris* (Cienk) Senn.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Oicomonas termo Ehrbg.
Tetramitus rostratus Perty.

Les Ciliés manquent complètement.

8. — SURFACE D'ESSAI III.

Éloigné de 3 kilomètres de l'oasis de *Figuig*. Terrain argileux, non cultivé. Plantes buissonnantes : *Thymelaea microphylla*, *Zilla spinosa*, *Launea arborescens*, *Linaria sagittata*, *Ononis glabrescens*. Espèces herbacées : *Echinops Boveivar, pallescens*, *Limonium Guyonianum*, *Peganum harmala*, *Noletia chrysocomoides*, *Fagonia longispina*, *Acluropus repens*, *Pennisetum dichotomum*.

a) Au printemps ;

Prise d'échantillon : avril. Teneur en eau : 3,9 p. 100, pH 8,35, température du sol : 25,°3 C.

Rhizopoda :

Amœba fluida Gruber.
Amœba limax Duj.
 x *Amœba lucens* Frenzel.

Amœba sphaeronucleolus Greeff.
Amœba terricola Ehrbg.
Naegleria gruberi Wilson.

Mastigophora :

Bodo celer Klebs.
Bodo edax Klebs.
Bodo ovalus (Duj) Stein.
 x *Mastigamœba invertens* Klebs.

Monas vivipara Ehrbg.
 x *Monas vulgaris* (Cienk) Senn.
Tetramitus rostratus Perty.

On remarque l'absence de *Cercobodo* et de Ciliés.

b) *En été.*

Prise d'échantillon : juin. Teneur en eau : 0,9 p. 100, pH 7,84.

Rhizopoda :

x *Amœba annulata* Pén.
Amœba diploidea Hartm-Nägl.

Amœba limax Duj.

Mastigophora :

Bodo celer Klebs.
Bodo edax Klebs.
Cercomonas longicauda Stein.

Oicomonas termo (Ehrbg) S. Kent.
Phyllomitus undulans Stein.
Tetramitus rostratus Perty.

Les Ciliés sont rares en cette saison, mais malgré la grande pénurie en eau il y avait quand même quelques espèces.

9. SURFACE D'ESSAI V.

Oasis de Beni-Ounif; palmeraie cultivée. En avril, la surface étaitensemencée de *Hordeum vulgare*. Terrain argileux, entouré de *Phoenix dactylifera*. Mauvaises herbes apparues après la récolte : *Convolvulus arvensis*, *Launea nudicaulis*, *Brassica oleracea*.

a) *Au printemps.*

Prise d'échantillon : Avril. Teneur en eau : 26,5 p. 100, pH 8,80. Température du sol : 25°C.

Rhizopoda :

Amœba diploidea Hartm-Nägl.
 x *Amœba fluida* Gruber.
Amœba froschi Nägler.
 x *Amœba gorgonia* Pén.
Amœba limax Duj.
Amœba sphaeronucleolus Greeff.

Amœba terricola Ehrbg.
Amœba velata Parma.
Hartmannella hyalina (Dang) Alex.
Naegleria gruberi Wilson.
Vahlkampfia tachypodia Gruber.

Mastigophora :

<i>Bodo celer</i> Klebs.	<i>Monas vulgaris</i> (Cienk) Senn.
<i>Bodo edax</i> Klebs.	<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.
x <i>Bodo lens</i> (Müller) Klebs.	<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.
<i>Bodo ovatus</i> (Duj.) Stein.	x <i>Multicilia palustris</i> Pén.
x <i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch.)	<i>Oicomonas mutabilis</i> S. Kent.
H. Meyer.	<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg) S. Kent.
<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.	x <i>Tetramitus descissus</i> Perty.

Ciliata :

<i>Colpidium colpada</i> Stein.	<i>Metopus sigmoïdes</i> Clap.-Lach.
<i>Colpoda cucullus</i> Ehrbg.	<i>Oxytricha pellionella</i> O. F. Müll.
<i>Colpoda Steinii</i> Maupas.	<i>Pleurotricha lanceolata</i> Ehrbg.
<i>Glaucoma pyriformis</i> Ehrbg.	<i>Uroleptus musculus</i> Ehrbg.
<i>Glaucoma scintillans</i> Ehrbg.	

Le fait est remarquable que dans un sol ayant une teneur en eau assez élevée on trouve beaucoup d'espèces de Protozoaires, comme généralement lorsque les Ciliés dominent, la teneur en eau est élevée. Parmi les différents groupes d'animaux, il y avait des espèces très rares.

J'ai trouvé beaucoup d'Hydracarines et aussi des larves d'Acarines terrestres dans mes cultures.

b) En été.

Prise d'échantillon en juin. Teneur en eau : 3,2 p. 100, pH 8,52.

Rhizopoda :

x <i>Amœba annulata</i> Pén.	<i>Amœba radiosa</i> Duj.
<i>Amœba fluida</i> Gruber.	<i>Amœba sphæronucleolus</i> Greff.
<i>Amœba guttula</i> Duj.	<i>Amœba terricola</i> Ehrbg.
<i>Amœba limax</i> Duj.	

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.
<i>Bodo celer</i> Klebs.	<i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch)
<i>Bodo ovatus</i> (Duj) Stein.	H. Meyer.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	x <i>Monas vulgaris</i> (Cienk) Senn.
<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.	<i>Oicomonas mutabilis</i> S. Kent.
<i>Phyllomitus undulans</i> Stein.	<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg) S. Kent.
<i>Cercomonas crassicauda</i> Alex.	

Il est frappant que parmi les Rhizopodes il y ait eu exclusivement des espèces d'*Amœba*. Les Ciliés manquent complètement.

10. — SURFACE D'ESSAI VI.

Palmeraie avec mauvais sol au sud de l'oasis de Beni-Ounif. Les palmiers souffrent très visiblement du manque d'eau. Terrain argileux mêlé de sable. Flore : *Phoenix dactylifera*, *Peganum harmala*, *Haloxylon tamaracifolium*.

a) *Au printemps.*

Prise d'échantillon : avril. Teneur en eau : 2,6 p. 100, pH 8,35, température du sol, 24° C.

Rhizopoda :

Amœba albida Nägler.
Amœba diploidea Hartm.-Nägl.
Amœba fluida Gruber.
Amœba limax Duj.
Amœba terricola Ehrbg.

Amœba velata Parona.
Hartmannella hyalina (Dang.) Alex.
Nægleria gruberi Wilson.
 x *Vahlkampfia magna* Jollos.

Mastigophora :

Bodo celer Klebs.
 x *Bodo lens* (Müll) Klebs.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo bodo (H. Meyer) Lemm.
Cercomonas crassicauda Alex.
Cercomonas longicauda Stein.
 x *Colponema loxodes* Stein.

Dimorpha mutans Gruber.
 x *Mastigamœba invertens* Klebs.
 x *Monas vulgaris* (Cienk) Senn.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Phyllomitus undulans Stein.
Tetramitus rostratus Perty.

Aucune espèce de Ciliés n'a pu être isolée.

b) *En été.*

Prise d'échantillon : juin. Teneur en eau : 1,4 p. 100, pH 8,24.

Rhizopoda :

x *Amœba annulata* Pén.
Amœba diploidea Hartm.-Nägler.
Amœba fluida Gruber.
Amœba limax Duj.
 x *Amœba lucens* Frenzel.

Amœba terricola Ehrbg.
 x *Cochliopodium granulatum* Pén.
Hartmannella hyalina (Dang.) Alex.
Nucleria simplex Cienk.

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.
<i>Bodo obovatus</i> Lemm.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	<i>Monas vulgaris</i> (Cienk) Senn.
x <i>Cercobodo grandis</i> (Maskell) Lemm.	<i>Oicomonas mutabilis</i> S. Kent.
x <i>Cercobodo ovatus</i> (Klebs) Lemm.	<i>Phyllomitius undulans</i> Stein.
<i>Cercomonas crassicauda</i> Alex.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.

Il n'y avait aucune espèce de Cilié.

14. — SURFACE D'ESSAI XV.

Sable mouvant des dunes de l'Oued-Zousfana. Prise d'échantillon : avril. Teneur en eau : 1,7 p. 100, pH 8,55; température du sol : 27,5° C. Teneur en humus : 0,26 p. 100.

Je n'ai pas étudié d'échantillon pris en été.

Rhizopoda :

<i>Amœba albida</i> Nägl.	x <i>Amœba lucens</i> Frenzel.
<i>Amœba guttula</i> Duj.	x <i>Cochtiopodium granulatum</i> Pén.
<i>Amœba limax</i> Duj.	<i>Nægleria gruberi</i> Wilson.

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.
<i>Bodo celer</i> Klebs.	x <i>Monas vulgaris</i> (Cienk) Senn.
<i>Bodo edax</i> Klebs.	<i>Oicomonas mutabilis</i> S. Kent.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg.) S. Kent.
x <i>Cercobodo bodo</i> (H. Meyer) Lemm.	<i>Phyllomitius undulans</i> Stein.
<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.

Les Ciliés n'étaient représentés par aucune espèce.

Fait remarquable : même le sable mouvant n'est pas stérile et on peut en isoler un assez grand nombre de Protozoaires.

B. — Hauts-plateaux algériens.

12. — SURFACE D'ESSAI I PRÈS DE CHABOUNIA (1).

(TERRE STEPPIQUE SABLONNEUSE.)

Chabounia est situé sur les hauts-plateaux à 200 km. au sud d'Alger. Prise d'échantillon : février 1934. Teneur en humus :

(1) Voir travail de M. Killian. Ces *Annales*, t. 55, 1935, p. 573.

0,96 p. 100; P_2O_5 (soluble dans l'acide citrique) : 9,3 milligr.-
100 grammes; $CaCO_3$ — 4,4 p. 100; pH 7,91.

Rhizopoda :

Amœba albida Nägler.
x *Amœba annulata* Pén.
Amœba diploidea Hartm. Nägl.
x *Amœba fluida* Gruber.
Amœba horticola Nägler.

Amœba limax Duj.
x *Cochliopodium granulatum* Pén.
x *Diplochlamys timida* Pén.
Parmulina oblecta (Gruber) Pén.

Mastigophora :

Allas diplophysa Sandon.
x *Bodo angustus* (Duj.) Bütschli.
Bodo ovatus (Duj.) Stein.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo vibrans Sandon.

Cercomonas crassicauda Alex.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Oicomonas termo (Ehrbg.) S. Kent.
Tetramitus rostratus Perty.

Pas de Ciliés.

13. — SURFACE D'ESSAI II PRÈS DE CHABOUNIA (TERRE SALÉE COUVERTE DE *Suaeda fruticosa*.)

Prise d'échantillon en février 1934. Teneur en humus :
1,32 p. 100; P_2O_5 (soluble dans l'acide citrique) : 15 milligr. :
100 grammes; $CaCO_3$: 1,36 p. 100; pH = 7,14.

Rhizopoda :

Amœba diploidea Hartm.-Nägl.
Amœba froschi Nägl.
Amœba horticola Nägl.
x *Amœba lucens* Frenzel.
Amœba sphæronucleolus Greff.
Amœba terricola Ehrbg.

x *Cochliopodium digitatum* Greff.
x *Cochliopodium opalinum* Pén.
Nægleria gruberi Wilson.
x *Nuclearia delicatula* Cienk.
Nuclearia simplex Cienk.
Vahlkampfia magna Jollos.

Mastigophora :

Bodo caudatus Duj.
Bodo celer Klebs.
x *Bodorostratus* (S. Kent) Klebs.
Bodo saltans Ehrbg.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo bodo (H. Meyer) Lemm.
Cercobodo ovatus (Duj.) Stein.
Cercobodo vibrans Sandon.
Dimorpha mutans Gruber.

Mastigella commutans (H. Meyer)
Goldschm.
x *Monas arhabdomonas* (Fisch.) H.
Meyer.
Monas vivipara Ehrbg.
Monas vulgaris (Cienk) Senn.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Oicomonas termo (Ehrbg) S. Kent.
Tetramitus rostratus Perty.

Ciliata :*Halteria grandinella* O. F. Müll.| *Oxytricha pellionella* O. F. Müll.

Cette surface d'essai contient d'assez nombreuses espèces de Protozoaires (30) et même les Ciliés y sont représentés. Parmi les *Rhizopodes* et les *Mastigophores* se trouvent des espèces très rares : *Cochliopodium digitatum* Greef, *Nuclearia delicatula* Cienk; *Bodo rostratus* (S. Kent) Klebs, qui, jusqu'à présent, étaient inconnues dans le sol.

14. — SURFACE D'ESSAI III PRÈS DE CHABOUNIA.
(CHAMP DE CÉRÉALES.)

Prise d'échantillon : en février 1934. Teneur en humus : 1,47 p. 100; P_2O_5 (soluble dans l'acide citrique) : 9 milligr. 4; $CaCO_3$ 7,2 p. 100; pH = 8,27.

Rhizopoda :*Amœba limax* Duj.| *Nuclearia simplex* Cienk.**Mastigophora :***Bodo celer* Klebs.*Bodo edax* Klebs.x *Bodo lens* (Müller) Klebs.x *Bodo rostratus* (S. Kent) Klebs.*Cercobodo agilis* (Moroff) Lemm.x *Cercobodo ovatus* (Klebs) Lemm.*Cercobodo vibrans* Sandon.*Cercomonas longicauda* Stein.x *Mastigamœba invertens* Klebs.x *Mastigella Pénardii* Lemm.x *Monas vulgaris* (Cienk) Senn.*Oicomonas termo* (Ehrbg) S. Kent.**Ciliata :***Colpoda cucullus* Ehrbg.| *Glaucoma scintillans* Ehrbg.

Dans ce sol, le petit nombre de *Rhizopodes* est très frappant. Parmi les *Mastigophores*, la présence du très rare *Mastigella Pénardii* Lemm. est remarquable.

15. — SURFACE D'ESSAI IV PRÈS DE CHABOUNIA.
(TERRE TRÈS SALÉE AVEC *Statice delicatula*.)

Prise d'échantillons : de sol en février 1934. Teneur en humus : 1,60 p. 100; P_2O_5 (soluble dans l'acide citrique), 12 milligr. : 100 grammes; $CaCO_3$: 8,4 p. 100; pH = 8,35.

Rhizopoda :

<i>Amœba albida</i> Nägler.	x <i>Cochliopodium echinatum</i> Korot.
<i>Amœba sphaeronucleolus</i> Greeff.	<i>Nægleria gruberi</i> Wilson.
x <i>Amœba spinifera</i> Nägler.	<i>Nuclearia simplex</i> Cienk.

Mastigophora :

x <i>Cercobodo simplex</i> (Moroff) Lemm.	x <i>Multicilia lacustris</i> Lauterb.
x <i>Mastigella Penardii</i> Lemm.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.

Ciliata :

<i>Balantiophorus elongatus</i> Schew.	<i>Oxytricha pellionella</i> O. F. Müll.
--	--

A part le fait que les Protozoaires sont rares, on constate parmi les Mastigophores l'absence des espèces *Bodo* et *Monas*, ailleurs toujours présentes ; par contre apparaissaient deux espèces très rares : *Mastigella Penardii* Lemm. et *Multicilia lacustris* Lauterb. La rareté des Mastigophores est tout à fait remarquable.

16. — SURFACE D'ESSAI V PRÈS DE CHABOUNIA.
(SOL VIERGE AVEC *Atriplex halimus*, PEU SALÉ.)

Prise d'échantillon en février 1934. Teneur en humus : 1,61 p. 100 ; P_2O_5 (soluble dans l'acide citrique) ; 16 milligr. 4 : 100 grammes ; $CaCO_3$ 11,6 p. 100 ; pH = 8,31.

Rhizopoda :

<i>Amœba albida</i> Nägler.	x <i>Amœba nitida</i> Pén.
x <i>Amœba fluida</i> Gruber.	<i>Amœba sphaeronucleolus</i> Greeff.
<i>Amœba limax</i> Duj.	<i>Nuclearia simplex</i> Cienk.

Mastigophora :

<i>Allas diplophisa</i> Sandon.	x <i>Cercobodo ovatus</i> (Klebs) Lemm.
x <i>Bodo augustus</i> (Duj.) Bütschli.	x <i>Dallingeria drysdali</i> S. Kent.
<i>Bodo caudatus</i> Duj.	<i>Dimorpha mutans</i> Gruber.
<i>Bodo celer</i> Klebs.	x <i>Mastigella commutans</i> (H. Meyer)
<i>Bodo ovatus</i> (Kleb) Lemm.	Goldschmidt.
x <i>Bodo rostratus</i> (S. Kent) Klebs.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	x <i>Monas vulgaris</i> (Cienk).
x <i>Cercobodo bodo</i> (H. Meyer) Lemm.	<i>Oicomonas termo</i> (Ehrbg) S. Kent.
x <i>Cercobodo grandis</i> (Maskell) Lemm.	

Ciliata :

<i>Chilodon uncinatus</i> Ehrbg.	<i>Glaucoma scintillans</i> Ehrbg.
<i>Colpidium colpoda</i> Stein.	<i>Oxytricha pellionella</i> O. Müll.
<i>Colpoda cucullus</i> Ehrbg.	<i>Stylonychia pustulata</i> O. F. Müll.
<i>Colpoda steinii</i> Maupas.	<i>Uroleptus musculus</i> Ehrbg.
<i>Cyclidium glaucoma</i> O. F. Müll.	

Parmi les sols de Chabounia, celui-ci est le plus riche en espèces protozoaires (31).

La rareté des Rhizopodes y est frappante par opposition à la fréquence des Ciliés.

17. — TERRAIN A KORF-OUERG (CHABOUNIA).

Colline sablonneuse avec *Atriplex halimus*. Prise de l'échantillon : mars 1933.

Teneur en eau : 7,3 p. 100 ; teneur en humus : 0,79 p. 100 ; pH 6,67 ; conductivité électrique : $K_{18^{\circ}C} = 42,80 \cdot 10^{-5}$.

Rhizopoda :

x <i>Amœba fluitans</i> Gruber.	<i>Amœba velata</i> Paronæ.
<i>Amœba guttula</i> Duj.	x <i>Amœba vitræa</i> Hertw. Less.
<i>Amœba limax</i> Duj.	x <i>Cochliopodium ambiguum</i> Pén.
<i>Amœba sphæronucleolus</i> Greff.	x <i>Pelomyxa binucleata</i> Gruber.
<i>Amœba terricola</i> Ehrbg.	<i>Sphenoderia dentata</i> (Monier) Pén.

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	x <i>Cercobodo radiatus</i> (Klebs) Lemm.
<i>Bodo caudatus</i> Duj.	<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.
x <i>Bodo lens</i> (Müll) Klebs.	<i>Dimorpha mutans</i> Gruber.
x <i>Bodo obovatus</i> Lemm.	x <i>Mastigella commutans</i> (H. Meyer) Goldschm.
<i>Cercomonas crassicauda</i> Alex.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.
x <i>Cercobodo ovatus</i> (Klebs) Lemm.	

Ciliata :

<i>Balantiophorus elongatus</i> Schew.	<i>Oxytricha fallax</i> Stein.
<i>Balantiophorus minutus</i> Schew.	<i>Oxytricha pellionella</i> O. F. Müll.
<i>Euplotes charon</i> O. F. Müll.	

Beaucoup de *Nématodes* qui ont liquéfié l'agar ont apparu dans mes cultures.

18. — SOL A KORF-QUERG (CHABOUNIA).

Inondé en hiver, lors de la prise d'échantillons (mars 1933) ; terrain de bas-fond salin encore humide, avec gazon de jeunes graminées entre des buissons de *Suaeda fruticosa*.

Teneur en eau : 4,9 p. 100, teneur en humus : 0,94 p. 100 ; pH 6,39 ; conductivité électrique : $K_{18^{\circ}} = 17.8.10^{-5}$.

Rhizopoda :

Amœba albida Nägler.
Amœba froschi Nägler.
Amœba limax Duj.
 x *Amœba lucens* Frenzel.

Euglypha tuberculata Duj.
Nebela lageniformis Pén.
Phryganella nitidula Pén.

Mastigophora :

x *Bodo angustus* (Duj) Bütschli.
Bodo edax Klebs.
 x *Bodo obovatus* Lemm.
Bodo saltans Ehrbg.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo digitatus (H. Meyer) Lemm.
Cercobodo vibrans Sandon.
Cercomonas longicauda Stein.

x *Colponema loxodes* Stein.
Monas guttula Ehrbg.
Monas vivipara Ehrbg.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Oicomonas termo (Ehrbg) S. Kent.
 x *Rhynchomonas nasuta* (Stokes) Klebs.
 x *Tetramitus descissus* Perty.
Tetramitus rostratus Perty.

Ciliata :

Balantiophorus elongatus Schew.

| *Oxytricha pellionella* O. F. Müll.

Dans mes cultures le *Rhynchomonas nasuta* s'est multiplié abondamment. Cette espèce était de très petite taille (4-8 μ).

19. — SOL A KORF-QUERG (CHABOUNIA).

Champ de blé dans l'association d'*Atriplex*.

Prise de l'échantillon de sol : mars 1933.

Teneur en eau : 7,1 p. 100, teneur en humus : 0,89 p. 100, CaCO_3 : 13,2 p. 100 ; pH 6,73 ; conductivité électrique : $K_{18^{\circ}} = 45.70.10^{-5}$.

Rhizopoda :

<i>Amœba cucumis</i> Mart. Lew.	x <i>Diffugia lithophilites</i> Pén.
<i>Amœba diploidea</i> Hartn-Nägl.	<i>Nægleria gruberi</i> Wilson.
x <i>Amœba fluida</i> Gruber.	<i>Nebula collaris</i> (Ehrbg) Leidy.
<i>Amœba guttula</i> Duj.	<i>Parmulina oblecta</i> (Gruber) Pén.
<i>Amœba limax</i> Duj.	x <i>Pelomyxa fragilis</i> Pén.
<i>Amœba terricola</i> Ehrbg.	<i>Trinema complanatum</i> Pén.
x <i>Amœba vesiculata</i> Pén.	x <i>Vahlkampfa tachypodia</i> Gruber.
x <i>Cochliopodium granulatum</i> Pén.	

Mastigophora :

x <i>Bodo angustus</i> (Duj) Bütschli.	<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.
<i>Bodo caudatus</i> Duj.	<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.
<i>Bodo celer</i> Klebs.	x <i>Colponema loxodes</i> Stein.
<i>Bodo obovatus</i> Lemm.	x <i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch.) H. Meyer.
<i>Bodo ovatus</i> (Duj.) Stein.	<i>Monas vivipara</i> Ehrbg.
<i>Bodopsis alternans</i> (Klebs) Lemm.	x <i>Rhynchomonas nasuta</i> (Stokes) Klebs.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	<i>Scitomonas pusilla</i> Stein.
<i>Cercobodo alexeieffii</i> Lemm.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.
<i>Cercobodo bodo</i> (Meyer) Lemm.	

Ciliata :

<i>Balantiophorus elongatus</i> Schew.	<i>Colpoda steinii</i> Maupas.
<i>Colpidium colpoda</i> Stein.	<i>Glaucoma scintillans</i> Ehrbg.
<i>Colpoda cucullus</i> Ehrbg.	<i>Halteria grandinella</i> O. F. Müll.
<i>Colpoda maupasii</i> Enr.	<i>Paramœcium putrinum</i> Clap.-Lach.

Ainsi, le champ de céréales renferme un assez grand nombre d'espèces de protozoaires (40 espèces) ; les Rhizopodes sont aussi bien représentés que les Mastigophores et les Ciliés. Ce sol représente donc au printemps un bon biotope.

20. — SOL A KORF-OUERG (CHABOUNIA).

Sol complètement stérile avec efflorescences de sel.

Prise d'échantillons : mars 1933.

Teneur en eau : 6,7 p. 100 ; teneur en humus : 0,22 p. 100 ; pH 6,26 ; conductivité électrique : $K_{18} = 76.8.10^{-5}$.

J'ai constaté, avec surprise que les Protozoaires y sont nombreux, malgré la très faible teneur en humus et la très haute concentration en électrolytes du sol.

Rhizopoda :

Amœba albida Naegler.
Amœba diploidea Hartm.-Nägl.
x Amœba fluida Gruber.
Amœba limax Duj.
x Amœba Penardii Schout.
Amœba terricola Ehrbg.

x Amœba vesiculata Pén.
x Cochliopodium echinatum Kordt.
Euglypha olveolata Duj.
Euglypha mucronata Leidy.
Vahlkampfia tachypodia Gruber.

Mastigophora :

x Bodo angustus (Duj) Bütschli.
Bodo caudatus Duj.
Bodo celer Klebs.
x Bodo lens (Müller) Klebs.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo vibrans Sandon.
Cercomonas crassicauda Alex.
Cercomonas longicauda Stein.
Monas guttula Ehrbg.
Monas vivipara Ehrbg.

x Monas vulgaris (Cienk) Senn.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Oicomonas termo (Ehrbg.) S. Kent.
Phalansterium solitarium Sandon.
Pleuromonas jaculans Perty.
x Rhynchomonas nasula (Stokes)
 Klebs.
Scylomonas pusilla Stein.
Tetramitus rostratus Perty.

Je n'ai pu cultiver aucune espèce de Ciliés; ceux-ci paraissent ne pas supporter de concentration saline élevée.

Parmi les Mastigophores, il y a plusieurs espèces (*Phalansterium*, *Pleuromonas*, *Rhynchomonas*, etc.) qu'on trouve très rarement dans le sol, ailleurs.

C. — Sols de la Cyrénaïque.

J'ai étudié également deux échantillons de sols très intéressants qui ont été envoyés à notre Institut de Lybie par le *Comando Milizia Nazionale Forestale della Cirenaica*. Pour établir une comparaison avec les études précédentes, je signalerai, dans ce qui suit, quels sont les Protozoaires que j'ai pu isoler de ces sols.

21. — SOL DE CYRÉNAÏQUE n° 1.

Forêt composée exclusivement de *Juniperus phœnicea* L dans le territoire El Abiar, dans les environs de Umm-El Agebab, longitude Est 20°37'55", latitude Nord 32°21'35". Exposition Nord, altitude : 335 mètres. Les couches supérieures du sol sont

composées de *terra rossa*, au-dessous il y a des rochers calcaires assez friables. Pente du versant 20-50 p. 100.

Prise d'échantillon le 31 janvier 1934. Lors de la prise d'échantillon, le sol a été mélangé jusqu'à 15 centimètres de profondeur avec la surface.

Teneur en eau : 6,6 p. 100 ; teneur en humus : 4,4 p. 100 ; pH : 5,50.

J'en ai isolé les Protozoaires suivants :

Rhizopoda :

<i>Amœba dubia</i> Schæffer.	x <i>Cochliopodium granulatum</i> Pén.
<i>Amœba froschi</i> Nagler.	x <i>Pamphagus armatus</i> Lauterb.
<i>Amœba limax</i> Duj.	<i>Negleria gruberi</i> Wilson.
x <i>Amœba nilida</i> Pén.	x <i>Vahlkampfia magna</i> Jollos.
<i>Amœba velata</i> Parona.	x <i>Vahlkampfia tachypodia</i> Gruber.

Mastigophora :

<i>Bodo celer</i> Klebs.	x <i>Monas arhabdomonas</i> (Fisch.)
x <i>Bodo lens</i> (Müller) Klebs.	H. Meyer.
x <i>Bodo obovatus</i> Lemm.	<i>Monas guttata</i> Ehrbg.
<i>Cercobodo agilis</i> (Moroff) Lemm.	<i>Oicomonas mutabilis</i> S. Kent.
x <i>Cercobodo ovatus</i> (Klebs) Lemm.	x <i>Oicomonas quadrata</i> S. Kent.
<i>Cercobodo vibrans</i> Sandon.	<i>Phyllomitus undulans</i> Stein.
<i>Cercomonas longicauda</i> Stein.	<i>Tetramitus rostratus</i> Perty.

Ciliata :

Seulement *Halteria grandinella* O. F. Müller.

J'ai donc réussi à isoler de ce sol 24 espèces de Protozoaires. Parmi les Rhizopodes, figure *Pamphagus armatus* Lauterb ; parmi les Mastigophores, *Bodo obovatus* Lemm. et *Oicomonas quadrata* S. Kent qui sont des espèces très rares. Les autres espèces de Protozoaires ont été trouvées également dans les sols du Sahara, décrits antérieurement. Les deux espèces d'*Oicomonas* étaient attachées à de petites parties de détrit.

22. — SOL DE CYRÉNAÏQUE N° 2.

Forêt composée purement de buissons types du maquis *Pistacia lentiscus* L. (« un bosco puro di lentisco ») dans le territoire El Abiar, dans les environs de Umm-El Agebab. Longitude Est : 20°38'50", latitude Nord : 38°21'18", altitude :

330 mètres, situation Nord-Ouest. La couche supérieure du terrain est composée de *terra rossa*, au-dessous des rochers calcaires. Pente du versant : 40-30 p. 100.

Prise de l'échantillon dont la couche supérieure a été enlevée jusqu'à 12 centimètres de profondeur, le 31 janvier 1931.

Teneur en eau : 4,6 p. 100 ; teneur en humus : 3,90 p. 100 ; pH : 5,28. Les espèces suivantes de Protozoaires ont pu être isolées :

Rhizopoda :

Amœba albida Nägler.
Amœba dubia Schæffer.
 x *Amœba fluida* Gruber.
Amœba froschi Nägler.

Amœba limax Duj.
Amœba sphaeronucleolus Greeff.
Amœba velata Parona.
Euglypha alveolata Duj.

Mastigophora :

Bodo edax Klebs.
 x *Bodo lens* (Müller) Klebs.
 x *Bodo obovatus* Lemm.
Bodo ovatus (Klebs) Lemm.
Cercobodo agilis (Moroff) Lemm.
Cercobodo bodo (H. Meyer) Lemm.
Cercobodo vibrans Sandon.

Cercomonas longicauda Stein.
Monas vulgaris (Cienk.) Senn.
Oicomonas mutabilis S. Kent.
Oicomonas termo (Ehrbg) S. Kent.
Phyllomitus undulans Stein.
Tetramitus rostratus Perty.

Ciliata :

Colpidium colpoda Stein.
Colpoda Steinii Maupas.

Glaucoma scintillans Ehrbg.

Si nous comparons entre les deux sols de la Lybie, nous trouvons que la composition de la faune des Protozoaires ne présente pas de grandes différences. Leurs caractères ne diffèrent d'ailleurs pas essentiellement.

En comparant les terres désertiques à celles de la Lybie, on est frappé des grandes différences dans leur nature chimique. Les sols sahariens sont dans la plus grande partie très alcalins, les sols de la Lybie, au contraire, très acides et assez riches en humus. Il est vrai que les sols examinés de la Lybie étaient couverts de forêts.

Leur microfaune est cependant assez semblable.

Discussion des résultats.

J'ai donné dans ce qui précède, une liste assez longue et monotone des espèces de Protozoaires cultivées de 22 sols de l'Afrique du Nord. La question se pose de savoir si de pareilles énumérations présentent de l'intérêt.

Il n'y a aucun doute, il faut répondre par l'affirmative. La question se pose ensuite de savoir : qu'est-ce qui vit dans le sol ? Cette question une fois tranchée, un autre problème se pose plus important au point de vue biologique, écologique et sociologique. Cette vie, pourquoi existe-t-elle dans le sol ? Une fois que nous aurons exploré toutes les conditions chimiques, physiques, géologiques et autres, donc les facteurs abiotiques, et que nos renseignements sur les conditions microfloristiques et microfaunistiques seront aussi complets que possible, la question me semblera résolue.

J'estime donc que je ne me suis pas astreint en vain à ce pénible travail de déterminer les protozoaires du sol. A mon avis, de pareils travaux ne seront pas intéressants exclusivement au point de vue écologique et faunistique, mais ils seront aussi susceptibles d'applications pratiques.

On pourrait cependant se poser la question de savoir si les faits que je viens de découvrir par ma méthode indirecte correspondent à la réalité. On pourrait, en effet, m'objecter que dans les sols, dès leur prélèvement, il y a d'autres protozoaires que ceux isolés, et qui ne sont pas toujours à l'état actif. Il se pourrait que dans les sols dont on nous a expédié des échantillons les protozoaires vivent exclusivement à l'état enkysté, ils seraient donc à l'état de vie latent ; mais si nous tenons compte du fait que les protozoaires du sol sont particulièrement adaptés aux fluctuations des conditions physiques, chimiques et biologiques, ils peuvent fort bien être à l'état de vie active, même lorsque ces conditions sont au minimum. J'en conclus que toutes les espèces que nous avons isolées dans les divers milieux liquides existent également dans les conditions naturelles à l'intérieur du sol et y mènent une vie active. Elles se contentent de conditions extrêmement défavorables, en particulier d'une

teneur hydrique très basse; car si l'eau existe dans les sols sahariens en quantité minime, elle constitue pour les protozoaires qui sont généralement des formes aquatiques le facteur le plus important.

Il a été constaté que la teneur hydrique telle qu'elle a été observée dans les sols du Sahara et de Lybie est si faible qu'elle ne permettrait pas la vie active des Protozoaires dans le climat hongrois. Il résulte de même, des recherches de Killian et Fehér que, même à une teneur minime en eau, en été, il existe une abondante microflore dans le sol. S'il y a dans les sols presque secs, de nombreuses bactéries, champignons et algues, on ne peut pas ne pas admettre que les protozoaires y vivent activement.

L'adaptation de ces organismes se manifeste d'ailleurs extérieurement par leur taille minime. J'ai étudié de nombreux sols du monde entier, mais nulle part je n'ai trouvé de protozoaires aussi petits que dans les sols du Sahara et de la Lybie. Ils sont en moyenne deux à cinq fois plus petits qu'en Hongrie et que les formes qui vivent dans l'eau. Des Amibes, de même des Mastigophores de 2 à 5 μ sont très répandus. Leur petite taille représente indubitablement un caractère adaptatif car ils peuvent, par le fait, utiliser les couches les plus minces de l'eau capillaire et de l'eau d'adhésion entourant les particules solides.

Il est un autre fait très typique que leur taille minime ne change pas, même dans les milieux de culture les plus riches; ils s'y comportent exactement comme dans leur milieu naturel.

Il résulte de tout ce qui précède que les sols sahariens et lybiques renferment de nombreux protozoaires. Leur maximum est réalisé en hiver, leur minimum en été. Des sols utilisés par l'agriculture, tels les champs de céréales et les palmeraies renferment toujours de bien plus nombreuses espèces que les sols non cultivés.

Il existe des protozoaires, même dans les sables mouvants, quoique en très petit nombre. Il en résulte donc que même le désert sablonneux n'est pas dépourvu de ces organismes. Il est probable que leur répartition s'effectue à l'état enkysté par le vent. Lorsque ces kystes tombent sur le sol ils com-

mentent à germer quand les conditions de vie réalisent le minimum indispensable.

Dans les sols sahariens les Mastigophores sont au maximum. Les Rhizopodes renferment généralement moins d'espèces, parmi lesquelles prédominent souvent les Amibes. Quant aux Ciliés on ne les trouve qu'à une teneur hydrique plus élevée du sol. J'imagine que ces Ciliés sont incapables de diminuer leurs cellules au-dessous d'une dimension leur permettant la vie active. Mais lorsqu'ils disposent d'eau en quantité suffisante on en trouve un grand nombre d'espèces. J'ai trouvé de nombreuses espèces, inconnues jusqu'ici dans les sols et d'autres part des espèces rares.

J'ai pu isoler de quelques sols sahariens des Nématodes, des Rotatoires et des Acariens terrestres. Ce fait prouve qu'il renferme aussi des métazoaires inférieurs.

Pour finir, j'insisterai de nouveau sur le fait que dans les sols sahariens une quantité minime d'eau suffit pour assurer la vie aux protozoaires. Dans les zones tempérées, une teneur de 8-10 p. 100 d'eau ne leur suffit plus. Dans le désert, au contraire, on en trouve déjà à 1 p. 100. Ce fait fondamental présente un intérêt non seulement au point de vue théorique et biologique, mais aussi au point de vue pratique.

Le Gérant : G. MASSON.

